

# Lipide von *Borrelia burgdorferi*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Mohammad Hamid Hossain  
aus Karachi

Giessen 1999

Aus dem Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie

Institut für Medizinische Mikrobiologie

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. T. Chakraborty

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. med. H.-J. Wellensiek

Gutachter: Prof. Dr. med. C. Hornig

Tag der Disputation: 04. April 2000

*Für meine Eltern*

*Lernen ist wie Rudern  
gegen den Strom,  
sobald man aufhört,  
treibt man zurück*

Laotse

## Tagungsbeiträge

**Hossain MH**, Wellensiek HJ, Geyer R and Lochnit G.

Structural analysis of the lipids of *B. burgdorferi*.

2. Frankfurt/Giessen Borrelia Workshop Juni 1997, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Frankfurt

**Hossain MH**, Wellensiek HJ, Geyer R and Lochnit G.

Lipids of *B. burgdorferi* – a structural and immunological analysis

IBC Int. Conference on Spirochete Diseases Oktober 1998 am M.I.T. in Cambridge (Boston, MA), USA

**Hossain MH**, Wellensiek HJ, Geyer R and Lochnit G.

Lipids of *B. burgdorferi* – a structural and immunological analysis

10<sup>th</sup> Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor the Bestudering van Glycokonjugaten in November 1998 in Nuland, Niederlande

**Hossain MH**, Wellensiek HJ, Geyer R and Lochnit G.

Lipids of *B. burgdorferi* – a structural and immunological analysis

5. Werkstattberichte aus Natur- und Lebensmittelwissenschaften  
Justus-Liebig-Universität, Giessen, 1999

## Publikation

**Hossain MH**, Wellensiek HJ, Geyer R and Lochnit G. Lipids of *B. burgdorferi*  
(eingereicht)

## Abkürzungen

ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CL	Cardiolipin
CM	Chloroform/Methanol
CMAEW	Chloroform/Methanol/Acetat/Essigsäure/Wasser
CME	Chloroform/Methanol/Essigsäure
CMW	Chloroform/Methanol/Wasser
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat
DC	Dünnschichtchromatographie
DEW	Diisobutylketon/Essigsäure/Wasser
ECM	Erythema chronicum migrans
Gal	D-Galaktose
GalCer	Galaktocerebrosid
GC	Gaschromatographie
GC/MS	kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GlcNAc	2-Acetamido-2-deoxy-D-Galaktose (N-Acetyl-Galaktosamin)
HPTLC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
kDa	kilo Dalton
LCB	Lymphadenitis cutis benigna
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
LSIMS	Liquid-Secondary-Ion-Mass-Spectrometry
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight
MS	Massenspektrometrie
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
RT	Raumtemperatur

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Historischer Überblick	1
1.2.	Der Erreger	2
1.2.1.	Morphologie und Taxonomie	2
1.2.2.	Übertragung	6
1.3.	Klinik der Lyme-Borreliose	9
1.4.	Diagnostik der Lyme-Borreliose	12
1.5.	Therapie der Lyme-Borreliose	13
1.6.	Pathogenitätsfaktoren von <i>B. burgdorferi</i>	14
1.7.	Membranlipide	15
1.7.1.	Phospholipide	16
1.7.1.1	Glycerophospholipide	16
1.7.1.2.	Sphingolipide	17
1.7.2.	Glycolipide	19
1.7.2.1.	Glyceroglycolipide	19
1.7.2.2.	Glycerosphingolipide	19
1.8.	Problemstellung	19
<b>2.</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1.	Kultivierung und Aufarbeitung von <i>B. burgdorferi</i> B31	22
2.1.1.	Bakterienstämme	22
2.1.2.	Kulturbedingungen	22
2.1.2.1.	<i>B. burgdorferi</i> B31	22
2.1.2.2.	<i>Treponema pallidum</i>	23
2.2.	Nachweis der Antigene von <i>B. burgdorferi</i> B31 und <i>Treponema pallidum</i> mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblotting (Western-Blot)	23
2.2.1.	Probenaufbereitung	23
2.2.1.1.	<i>B. burgdorferi</i> B31	23
2.2.1.2.	<i>T. pallidum</i>	24
2.2.2.	SDS-PAGE	24
2.2.2.1.	Materialien	24

2.2.2.2.	Durchführung der SDS-PAGE	25
2.2.2.3.	Färben und Entfärben der Gele	26
2.2.3.	Immunoblotting (Western-Blotting)	26
2.2.3.1	Material	26
2.2.3.2.	Durchführung des Western-Blot-Verfahrens	28
2.2.3.3.	Proteinfärbung der Immobilonmembran	28
2.2.3.4	Immunfärbung der Immobilonmembran	29
2.3.	ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	29
2.3.1.	Material	29
2.3.2	Durchführung des ELISA	30
2.4.	Patientenseren	30
2.5.	Lipid-Analyse der Lipid-Antigene von <i>B. burgdorferi</i> B31	33
2.5.1	Extraktion der Lipide	33
2.5.1.1	Material	33
2.5.1.2.	Durchführung der Lipidextraktion nach Bligh & Dyer	33
2.5.2.	Entsalzung von Lipiden mittels Reversed-phase Kartuschen Chromatographie	34
2.5.3.	Trennung der Gesamtlipide an Aminopropylsäulen	34
2.5.4.	Dünnschichtchromatographie	34
2.5.4.1	Eindimensionale Dünnschichtchromatographie	35
2.5.4.2	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	35
2.5.5.	Chemische Färbungsmethoden	35
2.5.6.	Immunologische Färbung	36
2.5.7	SDS-PAGE und Western-Blotting der Lipide	37
2.5.7.1.	SDS-PAGE und Western-Blotting der extrahierten Lipide	37
2.5.7.2.	SDS-PAGE und Western-Blotting der chromatographierten Lipid-Fraktionen	37
2.5.8.	Bestimmung der relativen Lipidanteile	38
2.5.9.	Dünnschichtchromatographie der Lipidbande nach Extraktion aus dem Polyacrylamid-Gel	38
2.6.	Strukturanalyse der Glykolipide	39
2.6.1.	Bausteinanalyse der Kohlenhydrate	39
2.6.2.	Methylierungsanalyse	39
2.6.2.1.	Permethylierung	39
2.6.2.2.	Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung	40
2.6.2.3.	Kombinierte Gaschromatographie/Massenfragmentographie (GC/MS)	40
2.6.3.	Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (LSIMS)	41



2.6.4.	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF)	41
2.6.5.	Bestimmung der anomeren Konfiguration der Glykolipide	42
2.6.5.1.	Peracetylierung	42
2.6.5.2.	Chromtrioxid-Oxidation	42
2.6.6.	Perjodat-Oxidation	42
2.6.7.	Fettsäure-Analyse	43
2.6.7.1.	Hydrolyse der Glykolipide nach Gaver und Sweeley	43
2.6.7.2.	Herstellung von Methylestern	43
2.6.7.3.	Acetylierung von Hydroxyfettsäuremethylestern	44
2.6.7.4.	GC/MS der Fettsäuremethylester	44
2.7.	Dot-Blot-Analyse der <i>B. burgdorferi</i> B31-Phospholipide	44
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1.	Nachweis der Antigene von <i>B. burgdorferi</i> mittels SDS-PAGE und Immunoblotting	46
3.2.	Isolierung der Lipide von <i>B. burgdorferi</i>	48
3.3.	SDS-PAGE und Immunoblotting der extrahierten Lipide	48
3.4.	Dünnschichtchromatographie der Lipide	49
3.5.	Chemische Färbung der Lipidfraktionen	50
3.6.	Immunologische Färbung	52
3.7.	SDS-PAGE und Western-Blotting der chromatographierten Lipid-Fraktionen	56
3.8.	Dünnschichtchromatographie der Lipidbande nach Extraktion aus dem Polyacrylamid-Gel	56
3.9.	Bestimmung der relativen Lipidanteile	58
3.10.	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	59
3.11.	Strukturanalyse der Glykolipide	59
3.11.1.	Kohlenhydratbausteinanalyse der Gesamtlipide von <i>B. burgdorferi</i>	59
3.11.2.	Methylierungsanalyse	60
3.11.3.	Bestimmung der anomeren Konfiguration des Kohlenhydratanteiles der Glykolipide	62
3.11.4.	Massenspektrometrie (MALDI-TOF) der Lipide von <i>B. burgdorferi</i>	62
3.11.4.	Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (LSIMS) der Phospholipide	64
3.11.6.	Fettsäure-Analyse der Lipide von <i>B. burgdorferi</i>	65

3.12.	Darstellung der Immunogenität des Galaktose-Restes an den GlykolipidenBolip 7 und 8 mittels Perjodat-Oxidation	67
3.13.	Darstellung der Antigenität der Phospholipide von B. burgdorferi durch Komplexierung mit Phosphatidylcholin und Cholesterin	68
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>85</b>

# 1. Einleitung

*Borrelia burgdorferi*, ein Bakterium aus der Familie der Spirochäten, ist das infektiöse Agens der Lyme-Krankheit oder Lyme Borreliose. Der Erreger wird durch den Biß von infizierten Zecken übertragen und ruft ein multisystemisches Krankheitsbild sowohl beim Menschen als auch bei verschiedenen Tierarten hervor. Die klinischen Symptome betreffen meist Haut, Gelenke, ZNS, Herz und Augen [1-3]. Während inzwischen viel über die klinischen Erscheinungsformen der Lyme-Krankheit bekannt ist, sind Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren von *B. burgdorferi* zum großen Teil noch unklar.

## 1.1. Historischer Überblick

Die Lyme-Borreliose hat eine lange und lehrreiche Vorgeschichte. Beschreibungen von dermatologischen Manifestationen der heutigen Lyme-Borreliose gehen in Europa bis auf das letzte Jahrhundert zurück. Die Geschichte beginnt bereits 1873 mit einer ersten Abbildung einer *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA) im *Atlas für Hautkrankheiten*, Rille 1898 [102], gefolgt von der Beschreibung eines *Erythema migrans* 1909 durch den schwedischen Arzt Arvid Afzelius [101] bei einer Patientin nach Zeckenbiß, und fand ihre ätiologische Aufklärung als Zecken übertragene Borreliose 1981 durch den Entomologen Willy Burgdorfer [1]. Dazwischen liegt eine lange Periode, in der Krankheitsbilder zwar mit einer durch Zecken übertragenen Infektion in Zusammenhang gebracht wurden, der sichere Erregernachweis gelang aber vor Burgdorfer niemandem.

Eine umfassende Darstellung und Benennung des Krankheitsbildes *Acrodermatitis chronica atrophicans* erfolgte bereits 1902 durch Karl Herxheimer und Kuno Hartmann in Frankfurt [103]. Der Wiener Benjamin Lipschütz berichtete 1914 über chronische Dermatosen nach Zeckenbiß und prägte auch den Begriff des *Erythema chronicum migrans* [104]. Ein Zusammenhang mit Zeckenbissen wurde von Anfang an erkannt und sowohl eine allergische als auch eine infektiöse Pathogenese diskutiert (Hellerström 1934) [105]. Eine erste Kasuistik einer Neuroborreliose publizierten die Franzosen Garin und Bujadoux 1922 [106]. Den gleichen Zusammenhang beobachtete auch Hellerström 1930 bei einem Fall von *lymphozytärer Meningitis* [107]. 1941 und 1944 beschrieb der Münchner Alfred Bannwarth das Krankheitsbild der *chronisch-lymphozytären Meningitis*, nahm aber eine rheumatische Genese an [108]. Erst Jahre später wurde die Bezeichnung *Meningopolyneuritis Garin-Bujadoux-Bannwarth* von Hörstrup und Ackermann geprägt [109].

Dermale Lymphome, früher als Lymphozytome bezeichnet, wurden 1943 von Bäfverstedt als gutartige lymphoretikuläre Proliferation der Haut definiert und als *Lymphadenosis cutis benigna* bezeichnet [110]. Insektenstiche, vor allem aber Zeckenbisse wurden schon von ihm,

später auch von Jordan (1951) als Krankheitsauslöser vermutet [111]. Die Autoren wiesen immer wieder auf vorangehende Erythemata und beobachteten auch Fälle mit nachfolgender Meningitis, Polyradiculitis sowie ACA und vermuteten für alle Krankheitsbilder ein gemeinsames infektiöses Agens. Die infektiöse Genese wurde gestützt durch die erfolgreiche Penicillintherapie von ACA durch Bianchi 1950 [112] und 1958 durch die erfolgreichen Übertragungsversuche von Hautbiopsien aus *Lymphadenosis cutis benigna* auf freiwillige Probanden durch Paschoud [113].

Kurz gesagt: Die Europäer spekulierten jahrelang über die Ätiologie, die Amerikaner, mit keiner langen Forschungsanamnese belastet, klärten sie konzentriert in wenigen Jahren auf.

Alles ging von zwei kleinen Ortschaften, Lyme und Old Lyme, in Connecticut/USA aus. Dort alarmierten zwei Hausfrauen 1975 das Gesundheitsamt über eine Endemie von Oligoarthritis und gaben sich mit der Anfangsdiagnose *Rheumatoide Arthritis* nicht zufrieden. Ihre Intervention führte zu ausgedehnten Untersuchungen von A.C. Steere und damit zur Beschreibung einer *Lyme Arthritis* [114]. Der Überträger war epidemiologisch zwar bald gefunden (Schildzecken der Gattung *Ixodes*), die diagnostische Suche nach dem Erreger ging aber erfolglos weiter. Im Jahre 1981 untersuchten Willy Burgdorfer und Jorge Benach im Rahmen eines Rickettsien-Forschungsprogrammes Zecken auf Long Island (NY, USA). Rein zufällig entdeckte Burgdorfer dabei Spirochäten im Mitteldarm der Zecken *Ixodes ricinus* und *Ixodes dammini*. Genauere Untersuchungen zeigten, daß es sich um Borrelien handelte und er vermutete, den Erreger der Lyme-Krankheit gefunden zu haben [1]. Zusammen mit Alan Babour gelang ihm die Isolierung und Kultivierung der Borrelien [60, 115]. Nachdem die Borrelien 1983 auch kulturell im Blut von Patienten mit Lyme-Krankheit und in Gewebeproben von *Erythema chronicum migrans* (ECM) nachgewiesen werden konnten, standen sie als Erreger der Lyme-Krankheit fest [116].

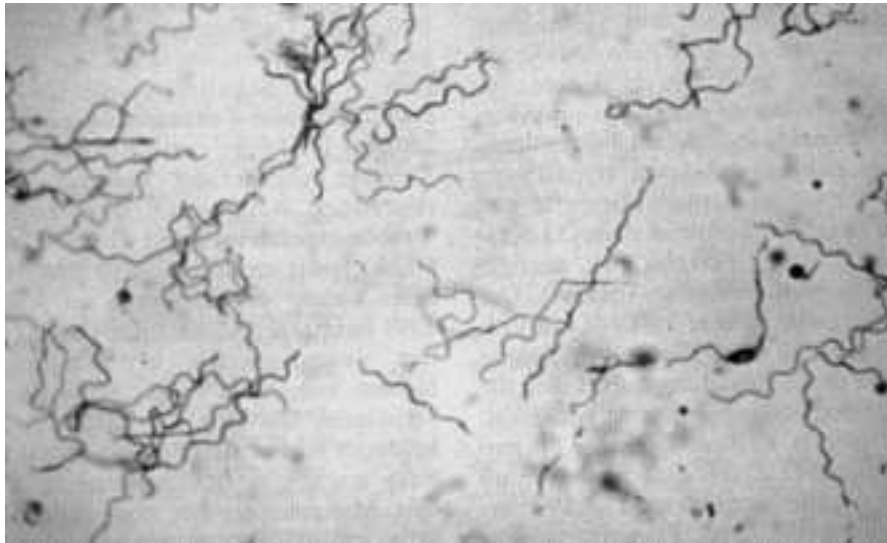
Auf dem 1. Internationalen Lyme-Krankheit Symposium 1983 in Yale, New Heaven, erhielt die Spirochäte den Namen *Borrelia burgdorferi*.

## 1.2. Der Erreger

### 1.2.1. Morphologie und Taxonomie

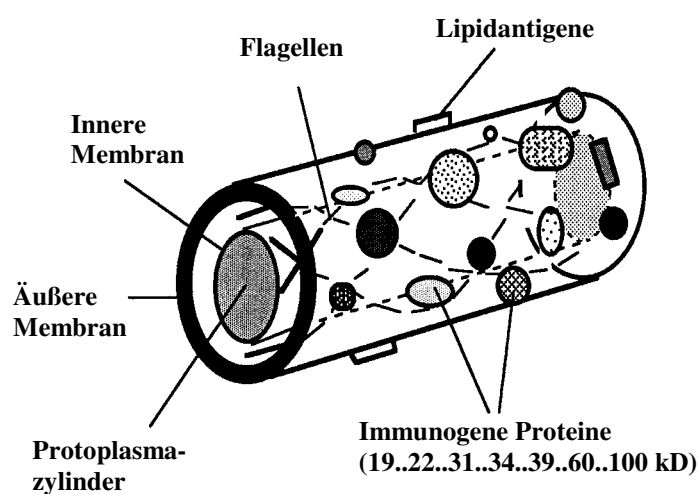
*Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) gehört zur Gattung der *Borrelia*, die zusammen mit den Gattungen *Spirochaeta*, *Christaspira*, *Treponema* und *Serpulina* die Familie der *Spirochaetaceae* bildet. Die Familie der *Spirochaetaceae* und *Leptospiraceae*, zu denen auch die Gattung *Leptospira* gehört, sind in der Ordnung der *Spirochaetales* zusammengefaßt [4, 5]. *B. burgdorferi* ist ein gramnegatives Schraubenbakterium, welches mit der Giemsa- oder Silberfärbung nachgewiesen werden kann (Abb. 1).

Der lichtmikroskopische Direktnachweis gelingt meist nur im Dunkelfeldmikroskop.



**Abb. 1** *B. burgdorferi*, isoliert aus dem Liquor einer Patientin

Borrelien haben eine Länge von 10-30  $\mu\text{m}$  und einen Durchmesser von 0.18 – 0.25  $\mu\text{m}$ . Wie bei gramnegativen Bakterien üblich, besteht die Zellwand aus einer inneren Membran, welche den protoplasmatischen Zylinder umgibt, und einer äußeren Membran. An der inneren Membran inserieren etwa 7 – 11 periplasmatische Flagellen, wodurch die gute Beweglichkeit gewährleistet wird [117-120] (Abb. 2 und 3).



**Abb. 2** Schematisch dargestellter Ausschnitt von *B. burgdorferi*



**Abb.3 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *B. burgdorferi* [242]**

F = Flagellen

I = Ansatzpunkt der Flagella

► = Pfeile weisen auf die Doppelkontur der Zellwand hin

Aufgrund von molekularbiologischen Untersuchungen der 16 S ribosomalen Gensequenzen und klinischer Symptomatik wurden Kriterien festgelegt, um zwischen 8 Subtypen von *B. burgdorferi* sensu lato zu unterscheiden (Tab. 1).

Analysen der „intergenic spacer“ Region der 5S-23S rRNA Gene von *B. burgdorferi* sensu lato zeigten, daß *Borrelia afzelii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae* und *Borrelia japonica* phylogenetisch näher mit *Borrelia garinii* verwandt sind als mit *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Borrelia garinii* wird als der phylogenetisch älteste Stamm angesehen. Von den 8 beschriebenen Genospezies werden nur *B. burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia valaisiana* als Erreger der Lyme-Borreliose angesehen. Die anderen Genospezies konnten noch nicht aus Lyme-Borreliose Patienten isoliert werden, sondern sind nur aus Isolaten von Zecken und Wildtieren bekannt.

Borrelien-Stämme	Bisherige Gruppe	Vorkommen
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto [3]		Europa und USA
<i>Borrelia garinii</i> [122]	20047	Eurasia
<i>Borrelia afzelii</i> [124]	VS461	Eurasia
<i>Borrelia japonica</i> [82]	F63B	Japan
<i>Borrelia andersonii</i> [83]	21123, auch 21038	USA
<i>Borrelia valaisiana</i> [84]	VS116 und M19	Eurasia
<i>Borrelia lusitaniae</i> [85]	PotiB2	Eurasia
<i>Borrelia bissettii</i> [86]	DN127	USA

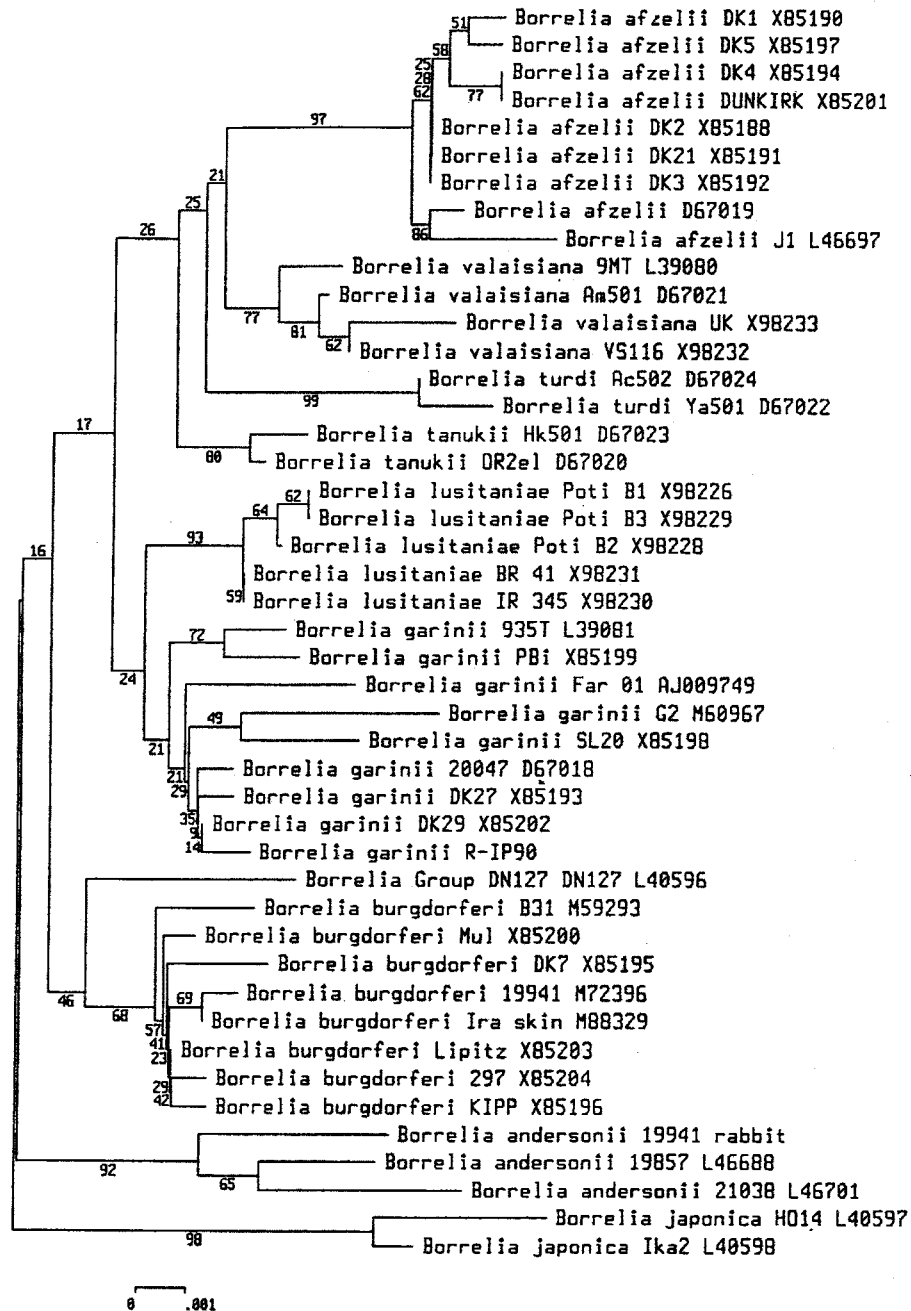
**Tab. 1 Stämme von *B. burgdorferi* sensu lato und ihre Verbreitung**

*B. afzelii* kommt relativ häufig in Zentraleuropa und Skandinavien vor (9-84%), während *B. garinii* häufig in Westeuropa vorkommt (10-72%). *B. burgdorferi* sensu stricto ist am häufigsten in den USA vertreten, scheint aber in keiner europäischen Region zu dominieren (0-20%). *B. valaisiana* konnte in Schweiz, Niederlanden, Großbritannien, Deutschland und Skandinavien isoliert werden, es scheint die häufigste Genospezies in Irland zu sein.

*B. lusitaniae* dagegen konnte bisher nur in vereinzelten Fällen in Portugal und Zentraleuropa isoliert werden.

Die Einteilung von *B. burgdorferi* sensu lato in Genospezies hat auch eine klinische Relevanz. Eine Infektion mit *B. burgdorferi* sensu stricto ist häufig assoziiert mit Arthritis, meist in Nord Amerika, wo es der einzige bekannte Erreger der Lyme-Borreliose ist. *B. garinii* ist meist assoziiert mit neurologischen Symptomen, während bei *B. afzelii* eher chronische Hauterkrankungen wie ACA im Vordergrund stehen. Überlappungen zwischen den Stämmen bezüglich der klinischen Symptome existieren. Das ECM können alle humanpathogenen Stämme hervorrufen, wobei in Europa bei *B. afzelii* häufiger ein ECM beobachtet wurde als bei *B. garinii*. Am wenigsten weiß man über *B. valaisiana*, es ist bisher klinisch nur mit dem ECM assoziiert.

*B. burgdorferi* sensu lato kann nur in Spezialnährmedien kultiviert werden (z.B. Barbour-Stoenner-Kelly-Medium) und hat seine optimale Wachstumstemperatur zwischen 34 und 37°C, wobei die Erreger als mikroaerophil gelten [126]. Die Replikationszeit beträgt unter Laborbedingungen bei 35°C etwa 11 bis 12 Stunden.



**Abb. 4 Phylogenetischer Baum von *B. burgdorferi* sensu lato [244]**

Daten basieren auf Vergleich der 16S rRNA Sequenzen.; bisherige Gruppenzugehörigkeit und Zugangsnummer (Accession number) der Sequenzen sind angegeben.

### 1.2.2. Übertragung

Die Übertragung von *B. burgdorferi* geschieht durch den Biß verschiedener Schildzeckenarten, in Europa vorwiegend durch *Ixodes ricinus* [127] (Abb. 5).

Zecken sind sehr anpassungsfähig, bevorzugen aber die gemäßigten Klimazonen bis auf eine Höhe von etwa 100 m ü.N., wobei die Rate der infizierten Zecken mit zunehmender Höhe abnimmt [128]. Sie benötigen eine relative Luftfeuchtigkeit von mindestens 75%. Geeignete



Biotope sind Laub- und Mischwälder mit reichlich Unterholz und einer dichten Krautzone, Fluß- und Bachläufe mit dichter Ufervegetation sowie moorige Gebiete.

In den untersten Vegetationsschichten findet sich eine nur wenig bewegte Luftschicht mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von mehr als 90%, in der Bodenmatte liegt die Luftfeuchte bei 100%. In diesen Gebieten finden die Zecken optimale Lebens- und Vermehrungsbedingungen [133].

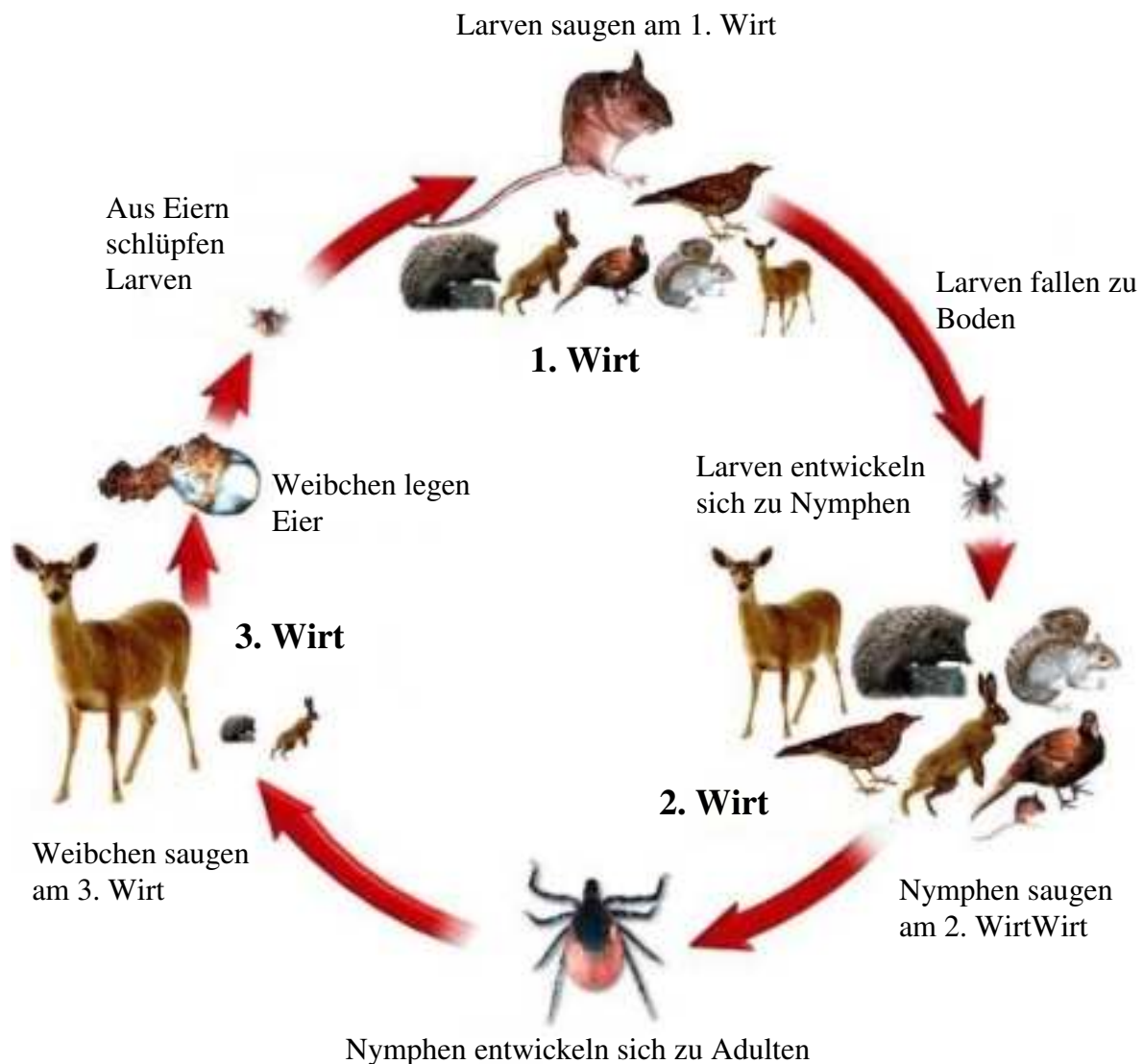
Ihre Entwicklung zeigt ein bimodales Aktivitätsmuster mit einem Maximum im Frühsommer und Spätherbst. Die Zecke entwickelt sich aus einem Ei über ein Larven- und Nymphenstadium zum adulten Tier. Für jede Metamorphose oder Eiablage ist eine vorangehende Blutmahlzeit unerlässlich (Abb. 6). Die Dauer des Lebenszyklus beträgt bei *I. ricinus* etwa 2 bis 3 Jahre, wobei die lokale Vegetation, das Klima und die Witterung einen entscheidenden Einfluß darauf haben [129].



**Abb. 5 Stadien der Zecke**

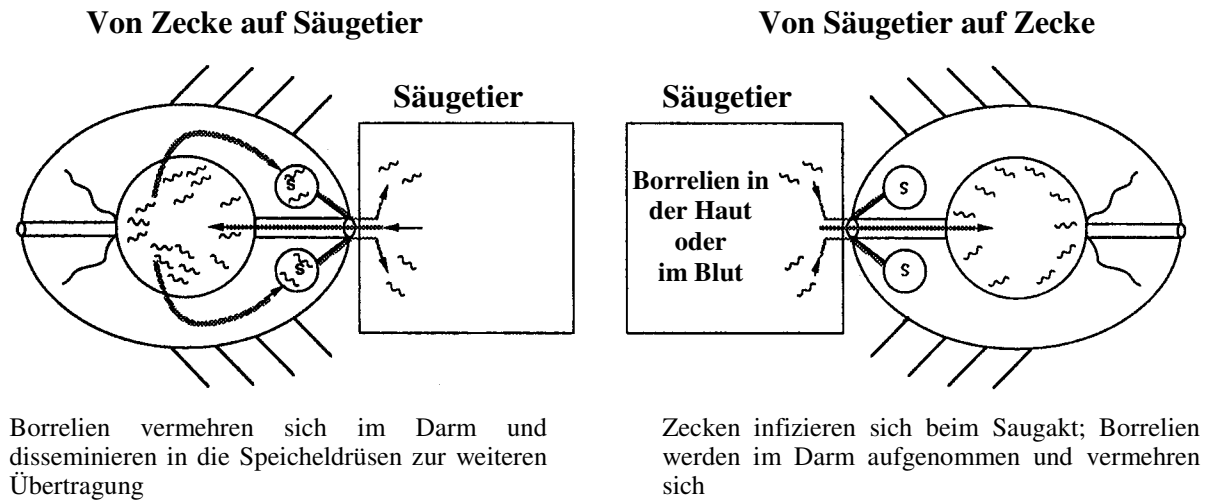
Das Wirtsspektrum von *I. ricinus* ist vielfältig. Bis heute sind 35 Säugerarten und 45 Vogel- bzw. Reptilienarten bekannt [130]. Während Larven und Nymphen in niedriger Höhe auf ihren Wirt warten und dementsprechend die kleinen Waldtiere wie Mäuse, Igel, Vögel und Eidechsen befallen, steigen die adulten Zecken auf größere Höhen (Gräser, Sträucher) und befallen bevorzugt die großen Waldtiere wie Füchse, Rotwild, aber auch Hunde und Katzen. In Deutschland sind Haupt- und Reservoirwirte für *I. ricinus* jedoch Kleinsäuger wie die Rötelmaus, die Gelbhalsmaus und die Waldmaus [127, 131, 132].

Die Borrelien werden beim Saugakt mit dem Wirtsblut aspiriert und sind dann im Zeckendarm nachweisbar. Im Mitteldarm verbleiben die Borrelien und bilden Aggregate, es findet aber auch regelmäßig eine Durchwanderung des Darmepithels statt mit Streuung via Hämolymphe in verschiedene Organe wie Speicheldrüsen und Ovarien [134]. Beim Biß werden die Borrelien dann auf den Wirt übertragen (Abb. 7 und 8). Der Übertragungsmodus ist nicht genau geklärt. Studien zufolge werden während das Saugens großen Mengen Speichel sezerniert, hierbei wird sowohl der Darminhalt als auch das infizierte Speicheldrüsensekret regurgitiert und beim Saugakt in den Wirt eingeschwemmt [135, 136]. Das Infektionsrisiko ist dabei entscheidend von der Saugdauer anhängig [137].

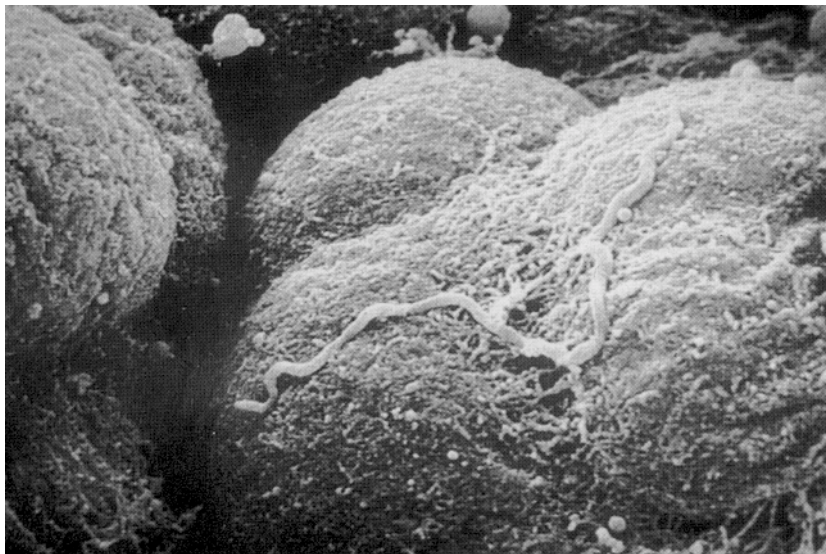


**Abb. 6 Lebenszyklus und Wirte der Zecken [243]**

Die relative Größe der Tiere entspricht ihrer Bedeutung als Wirtstier für die verschiedenen Lebensabschnitte der Zecke



**Abb. 7** Schematische Darstellung der Übertragung der Borrelien durch Zecken



**Abb. 8** *B. burgdorferi* im Darm einer Zecke [241]

### 1.3. Klinik der Lyme Borreliose

Die Lyme-Borreliose ist eine Multiorganerkrankung, gekennzeichnet durch eine Vielfalt an klinischen Erscheinungen und Wechselwirkungen [1-3]. Durch die Entdeckung des Erregers haben daher mehrere, bisher als selbständige nosologische Einheiten beschriebene Krankheitsbilder eine gemeinsame Ätiologie gefunden. Prinzipiell können im Rahmen der Erregerdissemination alle Organe befallen werden. Haut, Gelenke, Nervensystem und das Herz sind aber Prädispositionsorgane, die zu den bekannten und typischen

Krankheitsmanifestationen führen. Andere Organe wie Augen und Muskulatur sind eher selten betroffen [150-152].

Die Krankheit wird in 3 Stadien eingeteilt.

### **Stadium I (Stadium der Erstmanifestation):**

Im ersten Stadium tritt nach Zeckenbiß bei einem Teil der Patienten nach einer etwa 3-wöchigen Inkubationszeit eine flächenhafte wandernde Hautrötung auf, das *Erythema chronicum migrans* (ECM). Das ECM entwickelt sich an der Stelle des Zeckenbisses und breitet sich von einer kleinen Papel ausgehend zentrifugal aus. Es ist in der Regel handteller groß und blaßt im Zentrum ab. Das ECM ist meist von Myalgien, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Fieber und anderen Allgemeinsymptomen begleitet. Die Begleiterscheinungen und das ECM persistieren unbehandelt etwa 4 – 8 Wochen, heilen dann aber spontan ab [150-154]. Eine weitere, jedoch seltene Frühmanifestation stellt die Lymphadenitis cutis benigna (LCB) dar [110-113, 155, 156]. Bei der LCB zeigen sich typischerweise 2 – 4 cm große, blaurote Knoten an Ohr läppchen, Perimammilarregion und im Genitalbereich, meist mit begleitender Lymphadenopathie. Auch die LCB heilt unbehandelt nach Wochen ab. Auf das Stadium I kann mit zeitlicher unterschiedlicher Latenz eine Erregerdissemination und damit ein Stadium II mit Befall verschiedenster Organe folgen.

### **Stadium II (Stadium der Dissemination):**

Das 2. Stadium tritt in 15 – 25% der Fälle nach einer Latenzzeit von 2 – 8 Wochen, manchmal auch nach mehreren Monaten, auf [157]. Ausgehend vom ECM kann es im zweiten Stadium zu einer generalisierten Infektion (Fieber, grippeartige Symptome) oder zu lokalen Krankheitsmanifestationen in einzelnen Organen wie Nervensystem, Haut, Herz oder Bewegungsapparat kommen. Allgemeine Krankheitssymptome sind rezidivierende Fieberschübe, flüchtige Gelenkschmerzen, Kopfschmerzen, Abgeschlagenheit, Nachtschweiß und Gewichtsverlust. Die neurologischen Manifestationen umfassen die Trias Meningitis, kraniale Neuritis und Radikuloneuritis [158]. Letztere wird auch als lymphozytäre Meningoradikulitis Garin-Bujadoux-Bannwarth bezeichnet [108, 109, 159]. Häufig ist auch eine ein- oder doppelseitige Fazialisparese zu beobachten [160]. Die kardiale Manifestation als Karditis ist eher selten und hat Erregungsleitungsstörungen als Hauptsymptom. An den Augen wird zuweilen eine Konjunktivitis beobachtet [161, 162]. Vereinzelt kann es auch zu einer Iritis mit nachfolgender Glaskörpertrübung und Uveitis kommen. Insgesamt werden ophtalmische Komplikationen recht selten beschrieben [163, 164]. Dagegen werden relativ häufig Arthralgien und intermittierende Arthritiden beobachtet [165, 166, 172, 173, 174].

**Stadium III (Stadium der Chronizität):**

Das dritte, sogenannte Spätstadium, ist den chronischen Organerkrankungen vorbehalten. Es tritt gewöhnlich nach einer mehrjährigen Latenzzeit auf. Kennzeichnend sind Organmanifestationen der Haut, der Gelenke, dem Nervensystem und dem Herzen [167]. Die Hautmanifestation ist die *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA), die mitunter bis zum Erreichen des Endstadiums einen jahrzehntelangen Verlauf nehmen kann [168]. Hauptsymptome sind entzündlich-ödematöse Schwellung und livide Verfärbung der Haut im Bereich von Hand- und Fußrücken, Ellenbogen und Knien. Die Erkrankung geht nach jahrelangem Verlauf in das atrophische Stadium über, wobei die Haut papierdünn und faltig wird. Es entsteht der Aspekt der *Bratapfelhaut*. Meist erlöschen die Funktionen der Hautanhangsgebilde, wie z.B. der Schweiß- und Talgdrüsen. Die Venenzeichnung wird deutlich sichtbar, das Haar lichtet sich und Pigmentverschiebungen treten auf. In Gelenknähe entwickeln sich häufig charakteristische fibroide Knötchen.

Studien zufolge ist die *zirkumskripte Sklerodermie* als eine Variante der ACA aufzufassen [169]. Dabei kommt es zur Hautatrophie mit Ausbildung eines derb-sklerotischen Zentrums mit lividem Randwall. Der kausale Zusammenhang mit dem Lichen sclerosus et atrophicus wird noch diskutiert [170, 171, 217].

Gelenkmanifestationen mit flüchtigen Arthralgien und Arthritiden treten in allen Krankheitsstadien auf, die eigentliche Lyme-Arthritis ist jedoch eine Spätmanifestation. Dabei handelt es sich um eine akut beginnende Mon- oder Oligoarthritis, die vor allem die großen Gelenke, am häufigsten aber die Knie-Gelenke, betrifft [165, 166, 172, 173, 174]. Spontanheilungen kommen ebenso vor wie chronische Verläufe mit allmählicher Destruktion des Gelenks. Die neurologische Manifestation des 3. Stadiums ist die chronische Enzephalomyelitis. Ausgedehnte Lähmungserscheinungen wie Tetra- und Paraparesen sowie Hirnnervenausfälle sind die häufigsten Krankheitszeichen. Weiterhin kommt es zu zerebellären Symptomen, organischer Wesensänderung und Gedächtnisverlust sowie Demenz. Meist sind diese Erscheinungen Folge einer zunehmenden Demyelinisierung [175, 176].

Diese aufgestellte Einteilung in 3 Stadien muß jedoch nicht bei jedem Patienten auftreten. Der Übergang von einem zum anderen Stadium ist oft fließend und Symptome, die eigentlich verschiedenen Stadien zugeordnet werden, können auch gleichzeitig vorhanden sein. Die Reihenfolge der Stadien wird nicht immer durchlaufen und eine erste klinische Manifestation der Infektion kann in jedem Stadium erfolgen.

**Schwangerschafts- und Neugeborenenborreliose:**

Borrelien können während der Schwangerschaft transplazentar auf den Föten übertragen werden [177]. Mit den bisher vorliegenden Studien läßt sich weder beweisen noch widerlegen, daß eine fetale Lyme-Borreliose zu Komplikationen in der Schwangerschaft oder zu kindlichen Mißbildungen führt. Bei Infektion der Mutter im ersten Trimenon kann aber eine Mißbildung des Föten und somit ein Abort nicht ausgeschlossen werden. In mehreren Fällen konnte bei der Sektion von Fehl- und Frühgeburten der histologische und kulturelle Nachweis eines generalisierten Organbefalls mit *B. burgdorferi* erbracht und multiple Mißbildungen festgestellt werden [178]. Aufgrund zu geringer Fallzahlen läßt sich dieser Zusammenhang derzeit jedoch nicht beweisen. Beim derzeitigen Stand der Dinge wird empfohlen, die werdende Mutter bei einem Zeckenbiß während der Schwangerschaft prophylaktisch antibiotisch zu behandeln und die sonst übliche abwartende Haltung aufzugeben.

**1.4. Diagnostik der Lyme Borreliose**

Bei klinischem Verdacht einer Lyme-Borreliose kommt der Serologie für die Diagnosestellung eine wesentliche Bedeutung zu, da der Erreger nur in seltenen Fällen direkt nachgewiesen oder gezüchtet werden kann. Allerdings sind der serologischen Diagnostik Grenzen gesetzt. Vor allem in frühen Stadien der Infektion kann es aufgrund verspäteter Serokonversion zu falsch-negativen Ergebnissen in serologischen Tests kommen. In Frühstadien ist eine endgültige serologische Aussage nur durch eine 2-3 Wochen später erfolgende Zweituntersuchung möglich, da sich dann eine Titerbewegung feststellen läßt.

Heute übliche Routinemethoden sind der ELISA (Enzymimmunoassay), der IFT (Indirekter Immunofluoreszenz-Test), der Immunoblot und die PCR (Polymerase Chain Reaction) [179-184].

Der ELISA wird häufig als Suchtest eingesetzt. Ein fest an die Mikrotiterplatte gebundenes Antigenhomogenat dient dabei als Bindungsort für die im Patientenserum befindlichen Antikörper. Mittels enzymmarkierten polyvalenten Antihumanimmunglobulinen (Anti-IgM-, Anti-IgG und Anti-IgA-Antikörper) können die Patientenantikörper nachgewiesen werden. Da es sich bei den gängigen ELISA-Tests um Suchtests mit geringer Spezifität handelt, sollte im Anschluß an einen positiven ELISA ein IFT zur Bestätigung einer Verdachtsdiagnose durchgeführt werden. Dabei wird auf einen mit Borrelien beschichteten Objektträger Patientenserum in einer Verdünnungsreihe aufgetropft und gebundene Patientenantikörper durch Zugabe von fluoreszenzmarkierten Antihuman-IgM- oder Antihuman-IgG-Immunglobulinen sichtbar gemacht. Die Befundung erfolgt in Titerstufen.

Zur Beantwortung der Frage nach dem Krankheitsstadium (Frühstadium, chronischer Zustand bei Erregerpersistenz oder Serumnarbe nach abgeheilter Lyme Borreliose) wird ein Immunoblot im Westernblotverfahren durchgeführt. Hierbei kommt es nach Auftrennung der Borrelienantigene in der Gelelektrophorese zur Darstellung der Patientenantikörper gegen charakteristische Partialantigene von *B. burgdorferi*. Der Nachweis der gebundenen Patientenantikörper erfolgt mittels Zugabe von enzymmarkierten Antihuman-IgM- und Antihuman-IgG-Immunglobulinen.

Bei allen Tests können Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien, vor allem mit anderen Spirochäten wie Treponemen, falsch-positive Ergebnisse liefern. Ein positives Ergebnis ist daher stetes bezüglich seiner Spezifität abzusichern. Ein Hauptproblem ist allerdings die antigene Heterogenität des Erregers selbst. Antikörper in serologischen Tests lassen sich nur dann nachweisen, wenn auch das korrespondierende Antigen im Testansatz vorhanden ist.

Man kann demnach falsch-negative Ergebnisse erhalten, wenn das diagnostisch eingesetzte Borrelienisolat (z.B. ein amerikanischer Stamm) wenig Antigengemeinschaft mit demjenigen besitzt, welches zur Infektion des Patienten (z.B. ein europäischer Stamm) geführt hat. Hierin liegt die Hauptursache dafür, daß eine Standardisierung der Diagnostik bisher nicht gelungen ist und allgemein gültige Grenzwerte nicht angegeben werden können. Daher sind diskrepante Ergebnisse zwischen den einzelnen Laboratorien und den jeweiligen Testverfahren verschiedener Hersteller nicht selten.

Da die direkte Darstellung des Erregers nur selten gelingt, wird heutzutage immer häufiger die PCR in der Diagnostik der Lyme-Borreliose eingesetzt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten anhand geeigneter Zielsequenzen spezifisch die DNA von *B. burgdorferi* im Patientenmaterial nachweisen, jedoch steht diese Methode noch nicht für Routinezwecke zur Verfügung [179-184]. Mittlerweile ist das gesamte Genom von *B. burgdorferi* sequenziert und es ist nur noch eine Frage der Zeit, wann geeignete PCR-Methoden auch für Routineuntersuchungen zur Verfügung stehen [80].

## **1.5. Therapie der Lyme-Borreliose**

Schon seit 40 Jahren werden verschiedene Manifestationen der Lyme-Borreliose erfolgreich mit Penicillin behandelt. Klinische Studien der letzten Jahre zeigten aber, daß trotz adäquater Penicillintherapie Rezidive und Spätkomplikationen auftreten können [185]. Grundsätzlich haben die Manifestationen der Lyme-Borreliose eine große Spontanheilungstendenz, wobei aber die klinische Abheilung nicht gleichzusetzen ist mit der Heilung der Krankheit. Ähnlich wie bei der Lues kann sich *B. burgdorferi* inaktiv in Organgeweben aufhalten und erst Wochen oder Jahre später wieder in Erscheinung treten. Dabei kann es zu einem neuen Krankheitsschub mit Befall der früher betroffenen oder anderer Organe kommen, oder durch

dauernde Stimulation immunologische Vorgänge und eine chronische Entzündung unterhalten werden. Der klinische Verlauf ist oft kein zuverlässiger Parameter für die Eliminierung des Erregers und eine antibiotische Behandlung sollte über die klinische Heilung hinausgehen. Im weiteren sollte bei der antibiotischen Behandlung berücksichtigt werden, daß es sich bei *B. burgdorferi* um einen langsam wachsenden Keim handelt mit einer Generationszeit von 12 bis 18 Stunden. Für eine genügende Wirksamkeit der antibiotischen Therapie muß daher eine hohe Antibiotikakonzentration für mindestens 2 bis 3 Wochen gewährleistet sein. Aus diesem Grund ist die Gabe von Antibiotika mit langer Halbwertszeit grundsätzlich sinnvoller [186]. Das Antibiotikum ist so zu wählen, daß nicht nur im Blut, sondern in erster Linie auch in den verschiedenen Organgeweben, vor allem im ZNS, in den Gelenken oder in der Herzmuskulatur eine genügende Konzentration erreicht werden kann.

Aktuelle Therapieempfehlung:

Im Stadium I und im Übergang zu Stadium II mit leichten neurologischen und arthritischen Symptomen werden orale Antibiotika appliziert:

- a) Doxycyclin 2 x 100 mg, 2 bis 4 Wochen
- b) Azithromycin 1 x 500 mg, 7 Tage
- c) Roxithromycin 2 x 150 mg, 2 bis 3 Wochen

Im 2. und 3. Stadium ist eine orale Antibiose nicht mehr zu empfehlen. Erforderlich ist eine hochdosierte intravenöse Applikation liquorgängiger Antibiotika:

- a) Ceftriaxon 1 x 2g, 2 bis 4 Wochen
- b) Cefotaxim 3 x 2g, 2 bis 4 Wochen

Im zweiten Stadium werden meist noch gute Behandlungserfolge erzielt, im dritten Stadium kommt es jedoch zu zahlreichen Therapieversagern. Hier kommt die wiederholte Behandlung mit wechselnden Antibiotika in Betracht sowie eine längerfristige Nachbehandlung mit einem oralen Antibiotikum.

### **1.6. Pathogenitätsfaktoren von *B. burgdorferi***

Über die Pathogenitätsfaktoren von *B. burgdorferi* ist im Gegensatz zur Klinik und Epidemiologie noch wenig bekannt. Es wurden mehrere Oberflächenproteine und Oberflächenlipoproteine beschrieben, die eine Rolle bei der Wechselwirkung mit der körpereigenen Abwehr spielen [187-190].

Für die beiden plasmidkodierten Oberflächenlipoproteine OspA (*Outer Surface Protein A*) mit einem Molekulargewicht (MG) von 31 Kilodalton (kDa) und OspB mit einem MG von 34 kDa konnte nachgewiesen werden, daß sie die Produktion von Interleukin-6, Zytokinen und *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF  $\alpha$ ) durch Knochenmarksmakrophagen anregen [24, 191,



192]. Beide Lipoproteine sind auch teilweise an der Adhärenz von *B. burgdorferi* an Human-Endothelzellen beteiligt [193, 194, 195, 196]. Jedoch konnte für beide Lipoproteine festgestellt werden, daß zwischen verschiedenen *B. burgdorferi*-Stämmen Unterschiede im MG sowohl bei OspA als auch bei OspB bestehen [197, 198]. Für OspA ist bekannt, daß es von T-Zellen erkannt wird und schon in sehr geringen Konzentrationen in der Lage ist, die Proliferation von B-Zellen zu stimulieren [24, 190, 191, 192, 199]. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden 4 weitere plasmidkodierte Oberflächenlipoproteine von *B. burgdorferi* ermittelt [10, 18, 200, 201, 202]: OspC (MG 22 kDa), OspD (MG 28 kDa), OspE (MG 19.2 kDa) und OspF (MG 26.1 kDa). Neben diesen plasmidkodierten Oberflächenlipoproteinen ließ sich auch ein antigenes chromosomenkodiertes Glykoprotein (Oms66/p66) mit einem MG von 66 kDa identifizieren [187, 194, 201, 203, 204, 205, 206], es handelt sich dabei um ein Porin [141]. Ein anderes wichtiges Antigen ist das Flagellenprotein Flagellin, das ein MG von 41 kDa hat und spezifisch für die Gattung *Borrelia* ist [120, 207]. Sowohl dem Flagellin als auch dem OspA konnte eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden [208].

## 1.7. Membranlipide

Membranen legen die Außengrenze von Zellen fest und regeln den Austausch von Molekülen über diese Grenze. Sie sind widerstandsfähig, aber flexibel, selbstdichtend und selektiv permeabel für polare gelöste Stoffe. Ihre Flexibilität gestattet Formveränderungen, welche mit Zellwachstum und Bewegung einhergehen.

Membranen gliedern komplexe Reaktionsfolgen und spielen bei der biologischen Energiespeicherung und bei der Kommunikation zwischen den Zellen eine zentrale Rolle.

Dabei werden äußere Reize durch membranständige Rezeptoren aufgenommen, andererseits können Membranen selbst auch Signale erzeugen, die meist chemischer oder elektrischer Natur sind.

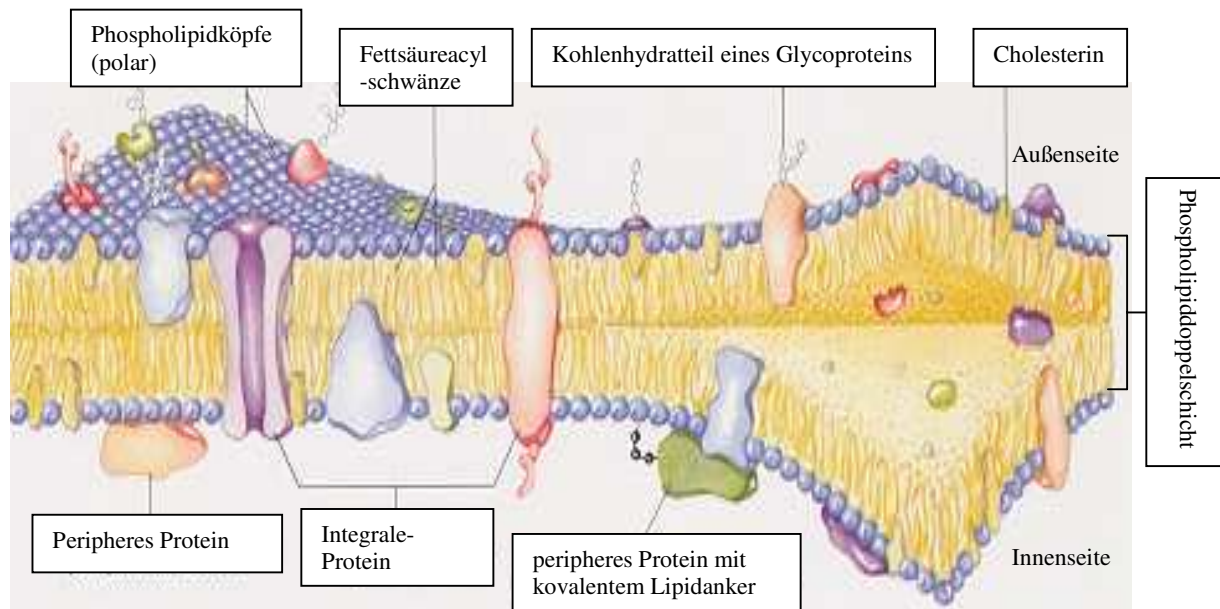
Membranen bestehen nur aus zwei Molekülschichten und sind daher mit einer Dicke von 6 bis 10 nm sehr dünn. Das wichtigste Merkmal des Aufbaus von Membranen ist eine Lipiddoppelschicht, die eine Schranke gegen den Durchtritt polarer Moleküle und Ionen bildet. In diese Lipiddoppelschicht verankert sind Proteine und Lipide, welche meist mit Kohlenhydratseitenketten substituiert sind.

Die Membranproteine haben spezielle Funktionen als Enzyme, Pumpen, Kanäle und Rezeptoren.

Die Membranlipide sind amphipatisch und lassen sich in drei Klassen einteilen: Cholesterin, Phospholipide und Glykolipide.

Die Phospholipide bilden die größte Gruppe der Membranlipide und leiten sich vom Glycerin oder Ceramid ab. Glykolipide bilden mit den Glykoproteinen die Glykokalix der Zellen und erfüllen wichtige biologische Funktionen [87, 88, 89] (Abb. 9).

Im folgenden soll verstärkt auf diese beiden Lipidklassen eingegangen werden.



**Abb. 9 Das Fluid-Mosaik-Modell der Membranstruktur [245]**

Die Fettsäureacylketten bilden im Innern der Membran einen hydrophoben Lipidsee, in denen integrale Membranproteine schwimmen. Sowohl Proteine als auch Lipide können sich innerhalb der Doppelschicht frei bewegen. Die an Proteinen und Lipiden gebundenen Kohlenhydrate zeigen immer zur extrazellulären Seite.

## 1.7.1 Phospholipide

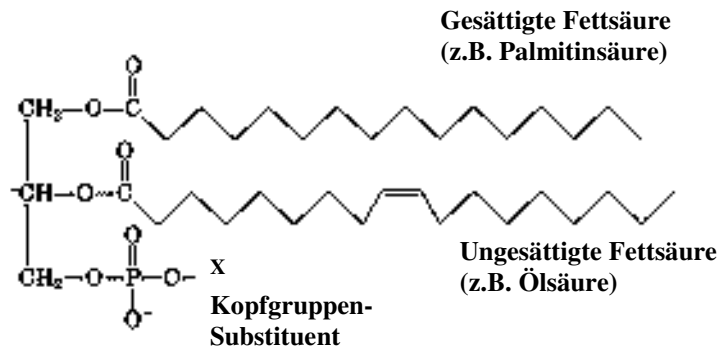
### 1.7.1.1. Glycerophospholipide

Membranen enthalten verschiedene Klassen von Lipiden, in denen zwei Fettsäuren über eine Esterbrücke mit C-1 und C-2 von Glycerin verknüpft sind, während an C-3 eine stark polare- oder geladene Kopfgruppe gebunden ist.

Von diesen polaren Lipiden kommen am häufigsten Glycerophospholipide in den Membranen vor. Bei Glycerophospholipiden ist ein polarer Alkohol über eine Phosphodiesterbindung an C-3 des Glycerins gebunden. Alle Glycerophospholipide sind Derivate der Phosphatidsäuren und werden nach ihren polaren Kopfgruppen benannt (z.B. Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin).

Für die Fettsäuren in Glycerophospholipiden steht eine breite Auswahl zur Verfügung. Sie variieren von Spezies zu Spezies und in den verschiedenen Geweben der gleichen Spezies. In der Regel enthalten Glycerophospholipide eine gesättigte Fettsäure an C-1 und eine

ungesättigte Fettsäure an C-2. Die Fettsäuregruppen sind im allgemeinen 16 oder 18 Kohlenstoffe lang [90] (Abb. 10).

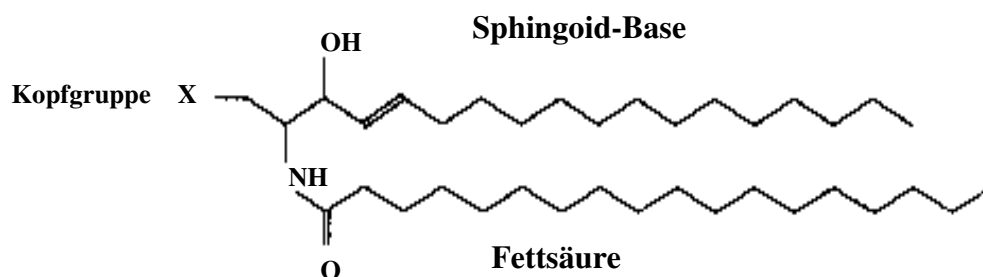


**Abb. 10 Allgemeine Struktur eines Glycerophospholipids**

### 1.7.1.2 Sphingolipide

Sphingolipide, die zweite Gruppe von Phospholipiden, haben ebenfalls einen polaren Kopf und zwei Fettsäuren, enthalten aber im Gegensatz zu Glycerophospholipiden kein Glycerin. Sie sind zusammengesetzt aus einem Molekül eines langkettigen Aminoalkohols, der sogenannten Sphingoid-Base, einem Molekül einer langkettigen Fettsäure und einer polaren Kopfgruppe.

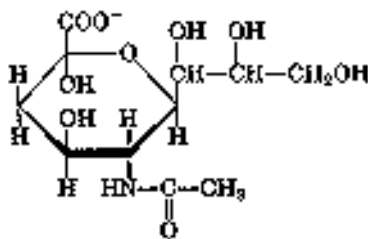
Die Kohlenstoffe C-1, C-3 und C-3 des Spingosinmoleküls tragen funktionelle Gruppen (-OH, -NH<sub>2</sub>, -OH). Durch Verknüpfung einer Fettsäure über eine Amidbindung mit der Sphingoid-Base entsteht ein Ceramid. Ceramid ist die allen Sphingolipiden gemeinsame Grundstruktureinheit [91, 92] (Abb. 11).



**Abb.11 Allgemeine Struktur eines Sphingolipids**

Es gibt drei Unterklassen von Sphingolipiden, die alle Derivate von Ceramid sind, sich jedoch in ihren Kopfgruppen unterscheiden:

- a) Sphingomyeline enthalten Phosphocholin oder Phosphoethanolamin als polare Kopfgruppe und werden daher gemeinsam mit den Glycerophospholipiden als Phospholipide klassifiziert. Die Myelinscheide, die die Axone myelinisierter Neuronen umgibt und isoliert, ist eine gute Quelle für Sphingomyeline [93].
- b) Glycosphingolipide sind zuckerhaltige Sphingolipide und enthalten einen oder mehrere Zucker in ihrer Kopfgruppe, diese sind direkt an die –OH-Gruppe am C-1 der Ceramideinheit gebunden. Als Zucker werden häufig D-Glucose, D-Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin gebunden. Diese Glycosphingolipide kommen hauptsächlich auf der äußeren Seite von Plasmamembranen vor. Bei Cerebrosiden ist nur ein Zucker an das Ceramid gebunden. Galaktosehaltige Cerebroside findet man typischerweise in Plasmamembranen von Nervengewebszellen [91-93].
- c) Ganglioside, die kompliziertesten Sphingolipide enthalten sehr große polare Köpfe, die aus mehreren Zuckereinheiten bestehen. Bei einer oder mehreren der terminalen Zucker der Ganglioside handelt es sich um N-Acetylneuraminsäure, die auch als Sialinsäure bezeichnet wird. Ganglioside machen etwa 6% der Membranlipide in der grauen Substanz des menschlichen Gehirns aus [94] (Abb. 12).



**Abb. 12 Allgemeine Struktur einer N-Acetylneuraminsäure**

## 1.7.2. Glycolipide

### 1.7.2.1. Glyceroglycolipide

Innerhalb der Glycolipide wird zwischen Glyceroglycolipiden und Glycerosphingolipiden unterschieden. Die Glyceroglycolipide kommen in Flora und Fauna vor und bilden die wichtigste Gruppe unter den Glycolipiden. Charakteristisch für Glyceroglycolipide sind *O*-glycosidisch an Diacylglycerol gebundene Mono-, Di- oder Trisaccharide [95] (Abb. 13).

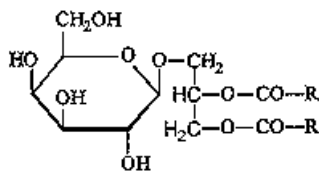


Abb. 13 Allgemeine Struktur von Glycolipiden

### 1.7.2.2. Glycerosphingolipide

Glycosphingolipide bilden eine weitere große Gruppe von Glycolipiden und bestehen aus einem Ceramid- und einem Kohlenhydratanteil [91, 92] (siehe 1.7.1.2. b und c).

Sie haben wichtige Funktionen in der Immunologie und sind hauptsächlich an der Differenzierung von Immunzellen beteiligt [96]. Glycosphingolipide besitzen antigene Eigenschaften, dies konnte z.B. für die humanen Blutgruppenantigene ABH, Lewis und Ii gezeigt werden [97, 98].

Störungen im Cerebrosid- und Gangliosidstoffwechsel verursachen die verheerenden Wirkungen verschiedener Erbkrankheiten wie der Tay-Sachs- und der Niemann-Pick-Krankheit [99, 229], aber auch bei Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematoses und Multiple Sklerose können Antikörper gegen Gangliosidstrukturen des Nervensystems nachgewiesen werden [230, 231].

Glycosphingolipide kommen in zahlreichen Bakterien vor [232, 233] und spielen eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion [234-240].

## 1.8. Problemstellung

Die Diagnostik der Lyme-Borreliose basiert hauptsächlich auf dem serologischen Nachweis der Oberflächenlipoproteine von *B. burgdorferi* im Immunoblot [6-15]. Die Identifizierung der Oberflächenproteine von *B. burgdorferi* stellte deshalb den Forschungsschwerpunkt in den letzten Jahren [5, 16-18] dar. Die wichtigsten Oberflächenproteine von *B. burgdorferi*

(OspA-F) [10, 12, 16-19] und *T. pallidum* sind Lipoproteine [13-15, 20-23]. Diese Dominanz von Lipoproteinen in beiden Bakteriengattungen spiegelt die Bedeutung der Proteinacylierung für die molekulare Architektur und Membranphysiologie der Bakterienzelle wider [142].

Es konnte gezeigt werden, daß die Lipoproteine klinisch relevante inflammatorische Eigenschaften besitzen [20, 24-26, 140] und daß diese auf deren Lipidbestandteile zurückzuführen sind [20, 27-30]. Gleichzeitig zeigten sich aber auch große Unterschiede in Verteilung und spezifischer Immunität dieser Lipoproteine, und das nicht nur zwischen amerikanischen und europäischen Stämmen von *B. burgdorferi*, sondern auch innerhalb einer Borrelienpopulation [19, 31-34]. Das ist auch einer der Gründe, weshalb eine allgemeingültige Standardisierung von serologischen Tests oder einer Vakzine so schwierig ist. Raoult et al. konnten zudem zeigen, daß Proteinantigene von *B. burgdorferi* eine hohe Kreuzreaktivität mit Seren von Patienten mit Syphilis oder Leptospirose besitzen [48].

Wenige Forschergruppen haben sich mit der Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi* beschäftigt. Es ist bekannt, daß sich Lipopolysaccharide (LPS) bei gramnegativen Bakterien nachweisen lassen [41, 43]. So konnten für Leptospiren [35-37] und Treponemen [38] Lipopolysaccharide nachgewiesen werden, während dies für *B. burgdorferi* noch nicht gelungen ist. Zwar wollten Beck et al. [46, 144] ein LPS bei *B. burgdorferi* charakterisiert haben, doch die Arbeitsgruppen um Eifert et al. [44] und Takayama et al. [39] konnten ein LPS bei *B. burgdorferi* nicht nachweisen. Auch Cinco et al. bestätigten die Abwesenheit von LPS in *B. burgdorferi*, wiesen aber auf die Existenz eines „LPS-like“ Antigens bei *B. burgdorferi* hin, welches ein MG von etwa 4-13 kDa hatte und stark mit Serum von Patienten mit Lyme-Borreliose reagierte [40, 44]. Die Arbeitsgruppe um Wheeler et al. fand ebenfalls keinen Hinweis auf ein LPS bei *B. burgdorferi*, konnte aber die Existenz zweier immunreaktiver Glykolipide im Chloroform-Methanol-Extrakt von *B. burgdorferi* darstellen [45]. Die Existenz zweier immunreaktiver Glykolipide wurde auch von Radolf et al. bestätigt [47]. Eine genaue chemische Charakterisierung dieser Glykolipide ist aber nicht erfolgt.

Es ist beschrieben, daß sich *B. burgdorferi* spezifisch an Galaktosylceramid und Glukosylceramid binden kann [138, 143], wobei es sich bei dem Rezeptor wahrscheinlich um ein Glykolipid, am ehesten ein Ceramidmonohexosid, handelt [138]. Die Bindung der Borrelien an Glykosphingolipide spielt eine wesentliche Rolle bei der Infektion der Wirtszelle durch *B. burgdorferi*. Bisher konnten 3 Proteine gefunden werden, die eine Rolle bei der Bindung an Glykosphingolipiden spielen: das 67 kDa Protein, 62 kDa Hsp60 und das 41 kDa Flagellin. Die Oberflächenlipoproteine scheinen bei der Adhäsion an Glykosphingolipiden keine Rolle zu spielen [139]. Weller et al. und Garcia-Monco et al. im Serum von Patienten mit Neuroborreliose regelmäßig Antikörper gegen Ganglioside nachweisen [146, 147, 148]. Diese Antikörper waren vor allem gegen Glykosphingolipide mit einer terminalen Galaktose

gerichtet. Es handelte sich bei diesen Antikörpern wahrscheinlich um kreuzreagierende Antikörper mikrobiologischen Ursprungs [149]. Diese kreuzreagierenden Antikörper gegen Glykosphingolipide könnten eine Rolle bei der Pathogenese der Neuroborreliose und anderer neurologischer Dysfunktionen der Lyme-Borreliose spielen [146-148].

Spirochäten wie Treponemen oder Leptospiren sind reich an Lipiden, verglichen mit anderen Bakterien [49-59]. Und im Falle von *B. burgdorferi* scheinen sie eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Lyme-Borreliose zu spielen. Das letzte Jahrzehnt hat unzählige Publikationen über die antigene Proteinzusammensetzung von *B. burgdorferi* geliefert, doch nur wenig ist über die Lipidstrukturen von *B. burgdorferi* bekannt.

In unserem diagnostischen Routine-Labor konnten wir regelmäßig in der Gelelektrophorese ein immundominantes Antigen in der Lauffront von Bromthymolblau nachweisen. Dieses niedermolekulare Antigen ( $< 10$  kDa) ließ sich nicht mit Proteinfarbstoffen darstellen, zeigte aber Attribute eines Lipids wie z.B. Löslichkeit in Chloroform. In dieser Arbeit wird die chemische Struktur und das immunologische Verhalten der antigenen und nicht-antigenen Lipide von *B. burgdorferi* analysiert. Detailliertes Wissen über die Strukturen dieser Lipide gibt uns wichtige Informationen bezüglich Pathogenese und Entwicklung neuer diagnostischer Testverfahren und protektiver Vakzine.

## 2. Materialien und Methoden

Die verwendeten Chemikalien wurden in pro analysi-Qualität bzw. als Lösungsmittel für die HPLC bezogen (Fluka, Neu Ulm; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg).

Das Aqua dest. wurde mit dem MILLI-Q Ultra-pure water system (Millipore, Eschborn) entsalzt und gereinigt.

### 2.1. Kultivierung und Aufarbeitung von *B. burgdorferi* B31

#### 2.1.1. Bakterienstämme

Folgende Erreger wurden in dieser Studie untersucht bzw. eingesetzt:

**a) *B. burgdorferi* sensu lato**

*B. burgdorferi* sensu stricto: Stamm B31 (amerikanischer Stamm)

**b) *Treponema pallidum* ssp. *pallidum***

Stamm Nichols (Fa. BAG, Lich, Deutschland)

#### 2.1.2. Kulturbedingungen

##### 2.1.2.1. *B. burgdorferi* B31

Der *B. burgdorferi* sensu stricto Stamm B31 wird in modifiziertem BSK H Medium (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 4 bis 5 Tage bei 33°C kultiviert [59-61] und einmal pro Woche passagiert. Zur Überprüfung der Vermehrung und Qualität der Borrelien wird täglich eine kleine Kulturprobe im Dunkelfeldmikroskop auf Anzahl und Beweglichkeit untersucht. Nach ca. 4 bis 5 Tagen haben sich die Borrelien in ausreichender Zahl vermehrt, so daß die Kultur geerntet werden kann. Hierzu wird das Bakterienmedium in einer Sorvall Superspeed RC 2-B Zentrifuge bei 12000 U/min und 4°C Kühlung für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakteriensediment (Pellet) dreimal in „phosphate-buffered saline“ (PBS, Phosphatpuffer, pH 7.2) gewaschen und anschließend in PBS aufgenommen. Die Proteinkonzentration der Borreliensuspension wird mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, USA) ermittelt und mit PBS auf 1 mg/ml eingestellt. Die Borreliensuspension wird portioniert und bei –20°C zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

<b>1-fach konzentrierte PBS-Lösung (Phosphate buffered saline)</b>	
- NaCl (Natriumchlorid, Merck)	15.2 g
- NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Natriumdihydrogenphosphat, Merck) · 2 H <sub>2</sub> O	1.25 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat, Merck) · 2 H <sub>2</sub> O	5.7 g
In 2000 ml Aqua dest. Lösen und auf pH 7.2 einstellen	



### 2.1.2.2. *Treponema pallidum*

*Treponema pallidum* ssp. *pallidum* Stamm Nichols wurde freundlicherweise von der Firma BAG in Lich zur Verfügung gestellt.

Kurz, die Treponemen wurden in Kaninchenhoden inokuliert und kultiviert, am 10. bzw. 11. Tag post infectionem aus dem Hodengewebe extrahiert und über Differential- bzw. Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt.

## 2.2. Nachweis der Antigene von *B. burgdorferi* B31 und *Treponema pallidum* mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblotting (Western-Blot)

Zur Darstellung der Borrelien- bzw. Treponem-Antigene wird eine Gelelektrophorese (Sodium Dodecyl Sulfate (=Natriumdodecylsulfat)–Polyacrylamide Gelelectrophoresis = SDS-PAGE) durchgeführt.

### 2.2.1. Probenaufbereitung

#### 2.2.1.1. *B. burgdorferi* B31

Bevor man die kultivierte *B. burgdorferi* B31-Suspension (B31-Suspension) in die SDS-PAGE einsetzen kann, muß diese zuerst solubilisiert werden. Hierzu wird in einem Reagenzglas 1 ml der B31-Suspension mit 150 µl reduzierender SDS-Lösung und 50 µl 1%iger Bromthymolblau-Lösung versetzt. Anschließend wird das Reagenzglas zum Mischen auf einen Rüttler gestellt und danach im Wasserbad vorsichtig aufgeköcht.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur kann die B31-Suspension in die SDS-PAGE eingesetzt werden. Die Solubilisierung mit der reduzierenden Lösung bewirkt Spaltung von Disulfidbrücken und Streckung von Polypeptiden und ermöglicht so die Auftrennung nach Molekulargewicht in der Gelelektrophorese. Das Bromthymolblau dient als Laufmarkierung. Die Elektrophorese wird beendet, sobald die Bromthymolblaufront das untere Ende des Trenngels erreicht hat.

<b>Benötigte Materialien:</b>	
Reduzierende SDS-Lösung (Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumdodecylsulfat)	
DTE (Dithioerythritol)	2 g
20% SDS-Lösung (20 g Natriumdodecylsulfat in 100 ml Aqua dest.)	10 ml
0.1 mmol PMSF (0.174 g Phenylmethansulfonylfluorid in 10 ml Isopropanol gelöst)	1 ml
1% Bromthymolblau-Lösung	
(1 g Bromthymolblau in 100 ml Laemmli-Puffer lösen (s. 2.2.1.c.))	

### 2.2.1.2 *T. pallidum*

Die gereinigte *Treponema pallidum*-Suspension wird unter Zugabe von 2% SDS zweimal kurz aufgekocht und nach Abkühlen mit 2% DTE und 4% Mercaptoethanol versetzt.

### 2.2.2. SDS-PAGE

In einer SDS-PAGE werden die Borrelien- bzw. Treponemenantigene nach Molekulargewicht aufgetrennt.

Hierzu wird ein 15%iges Polyacrylamidgel mit 2% SDS hergestellt. Die Auftrennung erfolgt in einem diskontinuierlichen Puffersystem, modifiziert nach Lämmli [67, 69].

Die Molekulargewichtsbestimmung der Proteinbanden erfolgte an Hand eines Standard-Protein-Gemisches (LMW-Calibration-Kit, Pharmacia), bestehend aus folgenden Referenzproteinen: Phosphorylase b (94 kD), Rinderserumalbumin (67 kD), Ovalbumin (43 kD), Carbon-Anhydrase (30 kD), Sojabohnen Trypsin Inhibitor (20.1 kD), Laktalbumin (14.4 kD).

#### 2.2.2.1 Materialien

##### a) 15% Trenngel

Acrylamid/Bisacrylamid (42 g Acrylamid, 0.7 g Bisacrylamid in 100 ml 8 M Harnstoff unter Erwärmen lösen und filtrieren)	12 ml
2 M Tris-Puffer (2 M Trishydroxymethyl-aminomethan in 8 M Harnstoff unter Erwärmen lösen, mit rauchender HCL auf pH 8.9 einstellen)	8 ml
8 M Harnstoff in Aqua dest.	19 ml
20% SDS-Lösung (20 g Natriumdodecylsulfat in 100 ml Aqua dest.)	400 µl
TEMED (N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin)	40 µl
10%iges APS (100 mg Ammoniumperoxodisulfat in 1 ml 8 M Harnstoff)	250 µl

##### 5% Sammelgel

Acrylamid/Bisacrylamid (50 g Acrylamid, 1.5 g Bisacrylamid in 100 ml 8 M Harnstoff unter Erwärmen lösen und filtrieren)	2 ml
2 M Tris-Puffer (2 M Trishydroxymethyl-aminomethan in 8 M Harnstoff unter Erwärmen lösen, mit rauchender HCL auf pH 8.9 einstellen)	2 ml
8 M Harnstoff in Aqua dest.	16 ml
20% SDS-Lösung (20 g Natriumdodecylsulfat in 100 ml Aqua dest.)	200 µl
TEMED (N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin)	20 µl
10% APS (100 mg Ammoniumperoxodisulfat in 1 ml 8 M Harnstoff)	150 µl

## b) Laemmli-Puffer

Tris (Trishydroxymethyl-aminomethan)	121 g
Glycin	576 g
NaN <sub>3</sub> (Natriumazid)	4 g
in 4000 ml Aqua dest. Lösen	

## c) Anoden-Puffer

Laemmli-Puffer	1000 ml
Aqua dest.	4000 ml

## d) Kathoden-Puffer

Laemmli-Puffer	270 ml
20% SDS-Lösung	23 ml
Aqua dest.	1125 ml

- e) Gelkammer, bestehend aus je zwei abgedichteten 12x20 cm großen Glasplatten (Desaga, Heidelberg, Deutschland)
- f) Elektrophoresegerät mit vertikaler Elektrophoresekammer für 2 Gele Modell Desaphor VA (Desaga) und Steuergerät Modell ECPS 3600/150 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- g) Pro Gel je 1 ml der solubilisierten *B. burgdorferi* B31-Suspension oder 1 ml Treponema pallidum-Suspension

**2.2.2.2 Durchführung der SDS-PAGE**

Die Gelkammer wird nach Anleitung des Herstellers (Desaga) aus zwei Glasplatten zusammengebaut und mit Aqua dest. auf Dichtigkeit überprüft.

Das 12.5%ige Trenngel wird wie beschrieben hergestellt (s. 2.2.1.a.) und blasenfrei bis 2.5 cm unterhalb des oberen Plattenrandes in jede Gelkammer eingefüllt. Die Polymerisation dauert etwa 30 Minuten. Um eine Austrocknung des Trenngeles zu vermeiden, wird das Trenngel mit 500 µl Aqua dest. überschichtet.

Nach der Polymerisierung des Trenngeles wird das Aqua dest. aus der Gelkammer abgegossen und das 5%ige Sammelgel hergestellt (s. 2.1.1.b.).

Das Sammelgel wird bis 1 cm unterhalb des oberen Plattenrandes eingefüllt und erneut mit 500 µl Aqua dest. überschichtet. Die Polymerisierung dauert etwa 60 Minuten.

Der Anoden-Puffer (s. 2.2.1.d.) wird hergestellt und in die Elektrophoresekammer gegossen. Nach ausreichender Polymerisierung wird die Gelkammer in die Elektrophoresekammer

gehängt und der Kathoden-Puffer (s.2.2.1.e) in das Oberteil der Elektrophoresekammer gefüllt.

Anschließend wird die solubilisierete Antigen-Suspension gleichmäßig auf das Sammelgel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wird an das Steuergerät angeschlossen und die Elektrophorese gestartet. Die Elektrophorese wird bei einer Betriebsspannung von 30 V, einer Betriebsstromstärke von 62 mA, einer Betriebsleistung von 3 W und einer Kammertemperatur von 20 °C durchgeführt. Nach etwa 16 Stunden ist der Lauf beendet und die Bromthymolblaufront steht 0.5 cm oberhalb des unteren Gelrandes.

Die Gelkammer wird aus der Elektrophoresekammer herausgenommen und das Gel zur weiteren Verarbeitung vorsichtig aus der Gelkammer herausgeholt.

### **2.2.2.3. Färben und Entfärben der Gele**

Zum Nachweis der Trennung wird an beiden Seiten ein 1 cm breites Gelstück abgeschnitten und für 2 Stunden in Coomassieblau Lösung (0.2% Coomassie R-250 in 50% Ethanol-10% Essigsäure) gefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgt 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in Entfärber-Lösung und mehrere Stunden in 10% Essigsäure. Die Färbung zeigt bei erfolgreicher Trennung die verschiedenen Proteinbanden auf dem Gel an.

Das restliche Gel wird im nachfolgenden Immunoblotverfahren eingesetzt.

#### **Entfärber-Lösung**

- 50% Ethanol-10% Essigsäure in Aqua dest.

### **2.2.3. Immunoblotting (Western-Blotting)**

Beim Westernblotting werden nach einer modifizierten Methode nach Towbin [68, 69] die aufgetrennten Antigene auf eine Immobilon-Membran (Millipore, Deutschland) übertragen und anschließend mit Patientenserum inkubiert und gefärbt.

#### **2.2.3.1. Material**

- a) Horizontal-Elektrophoresekammer Modell Multiphor II Nova Blot (Pharmacia)
- b) Immobilon P Transfermembran 0.45µm der Größe 12 x 20 cm (Millipore)
- c) Filterpapierzuschnitte der Größe 12.5 x 20 cm

## Blot-Transferpuffer

0.05 M Tris	6 g
0.04 M Glycin	3 g
20% Methanol	200 ml
Die Substanzen werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst	

## d) Blot-Blockierungspuffer

10%iges fetales Kälberserum (Sigma, Deisenhofen) in 0.1 M Ethylendiaminetetraacetic Acid (EDTA, Sigma) gelöst und auf pH 7.5 eingestellt

## f) 1-fach konzentrierte PBS-Lösung (Phosphate buffered saline)

NaCl (Natriumchlorid)	15.2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Natriumdihydrogenphosphat) · 2 H <sub>2</sub> O	1.25 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat) · 2 H <sub>2</sub> O	5.7 g
In 2000 ml Aqua dest. lösen und auf pH 6.5 einstellen	

## g) Blot-Waschpuffer

20 mM Tris	2.42 g
500 mM NaCl	29.2 g
In 1000 ml Aqua dest. lösen und auf pH 7.5 einstellen	

## h) Amidoschwarz-Lösung

- 0.5% Amidoschwarz in Entfärber-Lösung

## i) Entfärber-Lösung (s. 2.2.1.3)

## j) Zweit-Antikörper

- Peroxidase-markierter Kaninchen Anti-Human-IgG bzw. Anti-Human-IgM Antikörper (Dako, Hamburg), jeweils spezifisch für Gamma bzw. Lambda-Ketten

Peroxidase-Lösung:

50 mM Natriumacetat	6.8 g
100% Essigsäure	1.8 ml
Die Substanzen werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst	

k) Entwickler-Lösung (Substrat)

- 100 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol werden in 12,5 ml Dimethylformamid gelöst, mit 250 ml Peroxidase-Puffer verdünnt und mit 125 µl 30% Wasserstoffperoxid versetzt. Die Entwickler-Lösung sollte stets frisch angesetzt werden.

### 2.2.3.2 Durchführung des Western-Blot-Verfahrens

Vorbereitend wird die Immobilonmembran (Millipore) für eine Minute in 100% Methanol eingelegt und für 15 Minuten in Aqua dest. gespült. Durch diese Maßnahme wird die hydrophobe Oberfläche der Immobilonmembran hydrophiler.

Anschließend werden pro Polyacryamidgel 2 x 9 Filterpapiere mit Blottransfer-Puffer angefeuchtet und jeweils 9 Filterpapiere blasenfrei in die Transferzelle des Blotgerätes gelegt. Auf die feuchte Filterpapierschicht wird nun blasenfrei die vorbereitete Immobilonmembran gelegt. Alle Luftblasen werden mit einer kleinen Walze ausgestrichen.

Danach werden auf die Immobilonmembran weitere 9 feuchte Filterpapiere gelegt und die Transferzelle geschlossen. Das Blotgerät wird an die Stromquelle angeschlossen und eingeschaltet. Der Blotvorgang dauert etwa 2 Stunden bei einer Betriebsstromstärke von 250 mA.

### 2.2.3.3. Proteinfärbung der Immobilonmembran

Nach dem Blotvorgang wird die Immobilonmembran zur Neutralisation für 60 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Zur Kontrolle des Antigentransfers auf das Immobilon wird ein Blot-Randstreifen 5 Minuten mit Amidoschwarz-Lösung gefärbt und anschließend 2 Minuten mit Entfärber-Lösung entfärbt.

Danach wird die restliche Immobilonmembran zur Blockierung freier Bindungsstellen für eine Stunde in Blot-Blockierungspuffer gelegt.

#### 2.2.3.4 Immunfärbung der Immobilonmembran

Für die anschließende Immunfärbung wird die Immobilonmembran in 0.4 cm dünne Streifen geschnitten und in eine geeignete Waschschale mit Vertiefungen für die Blot-Streifen gelegt. Pro Untersuchung bzw. Patient werden zwei Streifen benötigt: ein Streifen zur Darstellung von IgM-Antikörpern, ein Streifen zur Darstellung von IgG-Antikörpern im Serum.

Die Streifen werden jeweils mit 5 ml Blot-Blockierungspuffer versetzt und die Waschschale für eine Stunde auf eine rotierende Tischschüttelmaschine (Braun, Deutschland) bei 80 Umdrehungen pro Minute gestellt.

Nach der Blockierung wird der Blot-Blockierungspuffer verworfen und die Streifen über Nacht auf der rotierenden Tischschüttelmaschine bei Raumtemperatur in jeweils 5.05 ml Patientenserum inkubiert (1:100, 50 µl Serum in 5 ml Blot-Blockierungspuffer).

Nach der Inkubation erfolgt dreimaliges Waschen der Streifen auf der rotierenden Tischschüttelmaschine mit jeweils 10 ml Blot-Waschpuffer für 10 Minuten.

Nach dem Waschen erfolgt die Inkubation der Streifen mit dem Zweitantikörper. Der verwendete Zweitantikörper ist jeweils ein Peroxidase-markiertes Kaninchen Anti-Human-IgG bzw. Anti-Human-IgM Immunglobulin (Dako, Hamburg), jeweils spezifisch für Gamma bzw. Lambda-Ketten.

Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:1000, 5 µl Zweitantikörper in 5 ml Blot-Blockierungspuffer) erfolgt für 1.5 Stunden auf der rotierenden Tischschüttelmaschine bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubation werden die Streifen erneut mit jeweils 10 ml Blot-Waschpuffer für 10 Minuten gewaschen und anschließend gefärbt.

Die Färbung erfolgt durch Hinzugabe von 5 ml Entwickler-Lösung je Streifen, es entstehen rot-braune Banden.

Sobald die Antigen-Banden gut sichtbar sind, wird die Färbung durch Waschen der Streifen mit Aqua dest. abgebrochen. Die nassen Streifen werden zwischen Filterpapieren getrocknet.

### 2.3. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

#### 2.3.1 Material

*B. burgdorferi* Screen Elisa Kit (Viramed, Planegg, Deutschland) zum gemeinsamen Nachweis von IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern im Humanserum gegen Antigene von *B. burgdorferi*. Der Elisa enthält eine Gesamtantigen-Präparation mit allen diagnostisch relevanten Proteinen. Es sind bisher 14 verschiedene borrelien-spezifische Proteine beschrieben, die mit dem VIRAMED Elisa nachweisbar sind.

Da der Screen Elisa die obengenannten Antikörper in einem Ansatz erfaßt, ist er besonders gut als Screeningtest geeignet.

### 2.3.2 Durchführung des ELISA

Der *B. burgdorferi* Screen Elisa Kit (Viramed) wird nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (Serumverdünnung 1:100). Nach der Extinktionsmessung wird anhand der mituntersuchten Kalibratoren der Grenzwert berechnet. Der Grenzwert liegt normalerweise bei 1.0, die negative Kontrolle unterhalb des Grenzwertes ( $< 0.6$ ) und die positive Kontrolle oberhalb des Grenzwertes ( $> 1.2$ ). Proben, deren Extinktion bis zu 10% unter dem Grenzwert oder 10% über dem Grenzwert liegen, gelten als grenzwertig und werden erneut getestet oder im Western-Blot untersucht.

### 2.4. Patientenseren

Die Serum-Proben stammen aus dem *B. burgdorferi* Routine Diagnostik Labor der Medizinischen Mikrobiologie der Universität Giessen.

Alle eingesetzten Seren wurden zuvor im *B. burgdorferi* Screen Elisa Kit (2.2.3) und im Western-Blot getestet (2.2.2.2.). Um die verschiedenen Seren miteinander vergleichen zu können, wurden alle Seren auf eine IgG-Konzentration von 8 mg/ml eingestellt.



Folgende Seren wurden eingesetzt:

Anzahl der Seren	Serum-Nr.	Stadium	ELISA	Bemerkung
10	12706 12728 13050 13070 13077 13088 13093 13100 13104 13127	keine Borreliose	negativ, um < 0.6	gesunde Spender, keine spezifischen Banden im Immunoblot, Negativkontrolle
5	12495 12716 12635 13091 13211	Borreliose I	Grenzwertig, um 1	ECM, unspezifische Allgemeinsymptome, schwache spezifische Banden im IgM-Blot
10	10763 11204 11701 12339 12522 12681 12955 13005 13238 13341	Borreliose II	positiv, um 1.5	Meningoradikulitis, Arthritis; starke spezifische Proteinbanden und Lipidbande im IgM- und IgG-Blot,

**Tab. 2 Getestete Patientenseren**

Anzahl der Seren	Serum-Nr.	Stadium	ELISA	Bemerkung
10	6000 6922 10309 11629 12480 12902 12960 13123 13038 13082 13064	Borreliose III	positiv, um 1.3	Arthritis, ACA, Enzephalitis; mäßige Proteinbande und Lipidbande im IgM- Blot, starke Banden im IgG-Blot
7	12177 12548 12673 12685 13194 13212 13286	abgelaufene Borreliose, Serumnarbe	grenzwertig, um 0,9	Keine Krankheitszeichen, spezifische Proteinbanden und Lipidbande nur im IgG- Blot
10	9125 10077 10567 10720 11004 11122 11279 11621 11687 12068	Syphilis II und III	Negativ, um 0,5	Syphilitische Hauterkrankungen, Neurosyphilis; spezifische Banden im IgM- und IgG- Treponemen-Blot, schwache Darstellung uncharakteristischer Proteinbanden im Borrelia-Blot, keine Lipidbande

**Tab. 2 Getestete Patientenseren (Fortsetzung)**

## 2.5. Lipid-Analyse der Lipid-Antigene von *B. burgdorferi* B31

Die Methoden der Lipidanalytik wurden modifiziert oder unverändert übernommen aus dem Manual von Kates [62].

### 2.5.1 Extraktion der Lipide

#### 2.5.1.1 Material

- a) 10 ml der *B. burgdorferi* B31-Suspension (1 mg/ml)
- b) Chloroform-Methanol-Gemisch (CM 1:2, v/v)
- c) 15 ml Zentrifugenröhrchen aus Glas mit Glasstopfen
- d) 30 ml Zentrifugenröhrchen aus Glas mit Glasstopfen
- e) Rüttlergerät (Heidolph)
- f) Rotierende Tischschüttelmaschine (Braun)
- g) Zentrifuge Minifuge (Heraeus)
- h) Ultrazentrifuge Sorvall Superspeed RC 2-B mit SS-34 Rotor (Du Pont)
- i) Rotationsverdampfer (Heidolph)

#### 2.5.1.2. Durchführung der Lipidextraktion nach Bligh & Dyer

Zur Extraktion der Borrelielipide werden 10 ml Borreliensuspension 10 Minuten bei 6000 u/min zentrifugiert, das Sediment in Aqua dest. resuspendiert und anschließend lyophilisiert. Nach Bestimmung des Trockengewichtes werden die Lipide nach einer modifizierten Methode nach Bligh & Dyer [63] extrahiert. Hierzu werden 10 mg der lyophilisierten Bakterien in 10 ml Aqua dest. suspendiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 Minuten bei 10000 U/min in der Ultrazentrifuge bei 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 1 ml Aqua dest. resuspendiert und in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 3.75 ml CM (1:2, v/v) überschichtet. Das Zentrifugenröhrchen wird mit einem Glasstopfen verschlossen und für 3 Minuten auf dem Rüttler intensiv geschüttelt. Anschließend erfolgt die Extraktion unter leichtem Schütteln auf dem Tischschüttelgerät (50 U/min) für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT). Nach der Extraktion wird die Suspension für 30 Minuten bei 6000 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand (Überstand 1) in ein zweites Gefäß pipettiert. Das Sediment wird erneut in 1 ml Aqua dest. aufgenommen, mit 3.75 ml CM (1:2, v/v) überschichtet und für 3 Min bei RT auf dem Rüttler geschüttelt. Danach wird wieder für 30 Minuten bei 6000 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand (Überstand 2) zu Überstand 1 gegeben. Die Überstände werden gemischt und in einem verschlossenen 30 ml Zentrifugenröhrchen aufbewahrt. Das Sediment wird in 1 ml PBS pH 6.5 suspendiert und in einem verschlossenen Reagenzglas zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Das Sediment dürfte nach der Lipidextraktion nur noch aus

proteinhaltigen *B. burgdorferi* B31-Antigenen bestehen. Zu den beiden Überständen werden jeweils 2.5 ml Chloroform und 2.5 ml Aqua dest. hinzugegeben. Nach kurzem Mischen, wird bei 6000 U/min für 30 Minuten und bei 4 °C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entsteht ein biphasisches System. Die obere hydrophile Phase besteht aus Methanol und Aqua dest. und den darin gelösten Bestandteilen (MP). Die untere lipophile Phase besteht aus Chloroform und den darin extrahierten Lipiden (CP). Beide Phasen werden vorsichtig abpipettiert, im Rotationsverdampfer abrotiert oder im Stickstoffstrom getrocknet und das Trockengewicht bestimmt. Nach Bestimmung des Trockengewichtes erfolgt die Entsalzung der Lipide der unteren lipophilen Phase.

### **2.5.2. Entsalzung von Lipiden mittels Reversed-phase Kartuschen Chromatographie**

Zur Entsalzung und Reinigung der Lipide werden Chromabond C18ec Kartuschen (Macherey&Nagel) mit 500 mg Säulenmaterial verwendet [65]. Zunächst müssen die Säulen mit 10 ml Methanol, 10 ml CM (2:1, v/v) und erneut mit 10 ml Methanol gewaschen werden. Danach erfolgt die Äquilibration der Säulen mit 10 ml Chloroform/Methanol/wässrige 0.1 M KCl (3:98:74, v/v/v). Die Proben werden in 5 ml TUP (Theoretical Upper Phase, Chloroform/Methanol/wässrige 0.1 M KCl (3:98:74, v/v/v) aufgenommen, kurz mit Ultraschall behandelt und auf die Säule aufgetragen. Das Probengefäß wird mit 5 ml TUP nachgewaschen. Die Säulen werden dann mit 10 ml TUP und 15 ml Aqua dest. gewaschen. Die Elution der Lipidfraktion erfolgt mit 15 ml CM (2:1, v/v). Die Lipidfraktion wird im Stickstoffstrom getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

### **2.5.3. Trennung der Gesamtlipide an Aminopropylsäulen**

Für die Trennung der Gesamtlipide werden Aminopropyl (NH<sub>2</sub>-Isolute)-Säulen (ICT, Bad Homburg) mit 100 mg Säulenmaterial verwendet [66]. Die Säulen werden mit 4 ml n-Hexan äquilibriert und die Probe in 0.5 ml Chloroform aufgegeben. Die Elution der Tri-, Di-, Monoglyceride und Cholesterol erfolgt mit 4 ml Chloroform/Propanol (2:1, v/v), die Elution der freien Fettsäuren mit 4 ml 2%iger Essigsäure in Diethylether und die Elution der Glyko- und Phospholipide mit 4 ml Methanol. Alle Elutionen werden im Stickstoffstrom getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

### **2.5.4. Dünnschichtchromatographie**

Die Lipidfraktionen werden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Hierzu werden High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)-Platten (10x20 cm, Kieselgel 60, Merck) verwendet. Die Proben werden in CM (2:1, v/v) aufgenommen (etwa 6-8 µg/µl) und in 7 mm breiten Spuren im Luftstrom eines Ventilators aufgetragen. Der Abstand zwischen den Spuren

beträgt 5 mm und an den Seiten 1.5 cm. Nach dem Auftragen wird die HPTLC-Platte 10 Minuten im Ventilator-Luftstrom getrocknet. Die Chromatographie der Platten erfolgt in geschlossenem Glastank (35x25x12 cm, Desaga) bei 12°C. Das Laufmittel wird vorbereitet und in den Glastank eingefüllt. Die HPTLC-Platte wird in den Gasraum gehängt und der Gasraum und die HPTLC-Platte mit dem Laufmittel äquilibriert. Beschleunigt wird die Äquilibrierung durch einen Ventilator im Deckel des Glastanks. Nach 15 Minuten wird die HPTLC-Platte in das Laufmittel abgesenkt und die Chromatographie gestartet. Nach etwa 50 Minuten und einer Laufstrecke von 8 cm wird die Chromatographie beendet. Die HPTLC-Platte wird herausgenommen und im Ventilator-Luftstrom getrocknet. Danach folgt die chemische oder immunologische Analyse der aufgetrennten Lipidfraktionen. Die aufgetrennten Fraktionen werden nachfolgend als Bolip (Borrelialipid) bezeichnet.

#### **2.5.4.1 Eindimensionale Dünnschichtchromatographie**

Da die Zusammensetzung der Borrelialipide unbekannt war, wurden folgende Laufmittel getestet, um die beste Auftrennung der Fraktionen zu erzielen:

- a) Chloroform/Methanol/Wasser (CMW, 65:35:5, v/v/v)
- b) Diisobutylketon/Essigsäure/Wasser (DEW, 40:25:5, v/v/v)
- c) Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser (CMEW, 25:15:4:2, v/v/v/v)
- d) Chloroform/Methanol/Aceton/Essigsäure/Wasser (CMAEW, 65:10:20:10:3, v/v/v/v/v)

#### **2.5.4.2 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie**

Die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie wird eingesetzt, um Glyko- und Phospholipide aufzutrennen. Hierzu wird auf 10x10 cm HPTLC-Platten mit CMW (65:15:2, v/v/v) eindimensional chromatographiert und die Platte gut im Ventilator-Luftstrom getrocknet. Danach wird die HPTLC-Platte um 90° gedreht und mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) chromatographiert.

#### **2.5.5. Chemische Färbungsmethoden**

##### **a) Jodfärbung**

Mit der Jod-Färbung lassen sich Lipide unspezifisch und zerstörungsfrei detektieren. Hierzu stellt man die HPTLC-Platte für 5-10 Minuten in einen Glastank mit gesättigter Jod-Atmosphäre, die Lipidbanden zeigen dabei eine deutliche reversible Gelbfärbung. Nach Detektion bzw. Dokumentation der Banden lässt sich das Jod unter einem Ventilator-Luftstrom wieder entfernen.

**a) Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Färbung**

Mit Orcinol lassen sich Kohlenhydratstrukturen anhand ihrer blauvioletten Färbung gut darstellen. Hierzu werden die trockenen HPTLC-Platten mit einer Lösung von Orcinol (Sigma) in 2 M Schwefelsäure (0.2 g Orcinol/100 ml 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) eingesprüht. Danach werden die HPTLC-Platten für 10-15 Minuten bei 110°C entwickelt. Durch die Färbung werden die Lipide zerstört.

**b) Ninhydrin-Färbung**

Mit dem Ninhydrin-Reagenz lassen sich primäre Aminogruppen durch eine rotviolette Färbung detektieren. Das Farbreagenz besteht aus 3%iger Lösung von Ninhydrin (Merck) in n-Butanol (Roth), welches 3% Essigsäure (Merck) enthält. Die HPTLC-Platte wird intensiv mit dem Reagenz besprüht und zur Detektion bei 110°C entwickelt. Die Färbung ist nur kurz haltbar.

**c) Phosphat-Färbung**

Mit der Phosphat-Färbung nach Dittmer und Lester [71] läßt sich organisch gebundenes Phosphat durch eine Blaufärbung darstellen. Hierzu werden zwei Stammlösungen hergestellt. Lösung A erhält man durch Lösen von 2 g MoO<sub>3</sub> (Sigma) in 50 ml 25 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Lösung B durch Lösen von 0.178 g Mo (Sigma) in Lösung A. Die Sprühreagenz erhält man durch Mischen der beiden Lösungen und Hinzugabe von 100 ml Aqua dest.. Die HPTLC-Platten werden eingesprüht und bei Raumtemperatur getrocknet. Die phosphathaltigen Banden erscheinen blau. Die Färbung ist begrenzt haltbar.

**d) Ammoniumsulfat-Veraschung**

Mit diesem Verfahren kann man die Lipidbanden quantifizieren. Die Lipide werden mit 20% Ammoniumsulfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> behandelt und durch Erhitzung auf 200°C für 30 Minuten verascht. Nach der Veraschung werden die relativen Lipidanteile densitometrisch bestimmt. Die Veraschung ist irreversibel und zerstört die Lipide.

**2.5.6. Immunologische Färbung**

Analog zum Western-Blotting können Immunfärbungen auch direkt auf der HPTLC-Platte durchgeführt werden [72]. Hierzu werden die Lipide auf der HPTLC-Platte nach der Chromatographie gut im Ventilator-Luftstrom getrocknet und anschließend eine Minute mit 0.5%iger Polymethylacrylat-Lösung in n-Hexan (Röhm&Haas) fixiert. Die HPTLC-Platte wird bei Raumtemperatur getrocknet und 1 Stunde mit Blot-Blockierungspuffer (s.2.2.2.1.e)

bei 4°C inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Blockieren wird die HPTLC-Platte 2 Stunden mit Patientenserum (verdünnt 1:100 in Blot-Blockierungspuffer) bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch zehnmaliges Waschen mit je 5 ml PBS, pH 7.2 (s. 2.1.2.1.) entfernt. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Peroxidase-markierten Kaninchen Anti-Human IgG Antikörper (s. 2.2.2.1.j., verdünnt 1:1000 in Blot-Blockierungspuffer) für 2 Stunden bei 4°C. Die HPTLC-Platte wird erneut 10 mal mit je 5 ml PBS gewaschen, um nicht gebundene Zweit-Antikörper zu eliminieren. Anschließend erfolgt die Darstellung der Banden mit der Entwickler-Lösung (Substrat, s.2.2.2.1.l.) bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Die Färbung dauert 10-20 Minuten und wird durch Waschen mit PBS gestoppt. Die Platte wird getrocknet, dokumentiert und bei -20°C aufbewahrt.

## **2.5.7 SDS-PAGE und Western-Blotting der Lipide**

### **2.5.7.1. SDS-PAGE und Western-Blotting der extrahierten Lipide**

Zur Untersuchung des immunologischen Verhaltens der Lipide nach Extraktion wird eine SDS-PAGE und ein Western-Blotting mit dem Gesamtlipid als Antigen durchgeführt. Hierzu wird nach Extraktion der Gesamtlipide nach Bligh & Dyer (s. 2.5.1.2.) die hydrophile (Proteine) und die lipophile Phase (Lipide) im Stickstoff-Strom getrocknet, das Trockengewicht der jeweiligen Phase bestimmt und die Trockensubstanzen mit der reduzierenden SDS-Lösung (s. 2.2.1.1.) solubilisiert. Die solubilisierten Substanzen werden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die SDS-PAGE wie beschrieben durchgeführt (s. 2.2.2.2.). Nach der SDS-PAGE wird wie beschrieben ein Western-Blotting durchgeführt (s. 2.2.3.2.), als Kontroll-Serum wird Serum von Patienten mit Borreliose Stadium II eingesetzt (s. 2.4.). Der Western-Blot der hydrophilen Phase dürfte nur die Protein-Antigene von *B. burgdorferi B31* anzeigen, während der Western-Blot der lipophilen Phase nur die Lipid-Antigene (< 10 kD) anzeigen dürfte.

### **2.5.7.2. SDS-PAGE und Western-Blotting der chromatographierten Lipid-Fraktionen**

Zur Feststellung des immunologischen Verhaltens der einzelnen Lipidfraktionen wird nach chromatographischer Auftrennung eine SDS-PAGE und ein Western-Blotting mit den einzelnen Lipidfraktionen als Antigen durchgeführt.

Nach einer präoperativen Dünnschicht-Chromatographie der Gesamtlipide (s. 2.5.4.) werden die individuellen Lipidbanden mit der reversiblen Jodfärbung dargestellt (s. 2.5.5.) und mit einem Skalpell auf der HPTLC-Platte markiert. Nach Entfernung des Jodes im Ventilator-Luftstrom werden die markierten Kieselgel-Areale von der Platte gekratzt und die Lipide mit CM (2:1, v/v) aus dem Kieselgel eluiert. Das Eluat wird im Stickstoff-Strom getrocknet und

das Trockengewicht bestimmt. Die Trockensubstanz wird mit der reduzierenden SDS-Lösung (s. 2.2.1.1.) solubilisiert und auf ein Polyacrylamid-Gel mit Slots aufgetragen. Hierzu wird eine Gelkammer aus zwei Glasplatten (Desaga) zusammengebaut und mit Aqua dest. auf Dichtigkeit überprüft (s. 2.2.2.2.). Danach wird das 12.5%ige Trenngel in die Gelkammer bis 2.5 cm unterhalb des oberen Plattenrandes gefüllt und mit 500 µl Aqua dest. überschichtet. Nach 40 Minuten Polymerisation wird das Aqua dest. verworfen und das 5%ige Sammelgel bis zum Plattenrand eingefüllt. Ein vorbereiteter Elektrophoresekamm mit 10 Slots (Größe der Slots: 0.7x1.5 cm; Volumen pro Slots: 200 µl) wird in das noch flüssige Sammelgel gehängt, um 10 separate Öffnungen im Sammelgel herzustellen. Nach etwa 4 Stunden ist das Sammelgel polymerisiert und der Elektrophoresekamm kann vorsichtig aus dem Sammelgel herausgezogen werden. Die Elektrophoresekammer wird mit Anodenpuffer gefüllt und die Gelkammer in die Elektrophoresekammer eingehängt. Der Kathodenpuffer wird in das Oberteil der Elektrophoresekammer eingefüllt und 100 µl der einzelnen solubilisierten Lipidfraktionen in jeweils ein Slot der Gelkammer pipettiert. Danach wird die Elektrophoresekammer an die Stromquelle angeschlossen und die Elektrophorese gestartet. Die SDS-PAGE wird standardmäßig durchgeführt (s. 2.2.2.2.). Nach der SDS-PAGE wird wie beschrieben ein Western-Blotting durchgeführt (s. 2.2.3.2.), als Kontroll-Serum wird wieder Serum von Patienten mit Borreliose Stadium II eingesetzt (s. 2.4.).

### **2.5.8. Bestimmung der relativen Lipidanteile**

Um die relativen Lipidanteile bestimmen zu können, wurden die aufgetrennten Lipide auf der chromatographierten HPTLC-Platte mit 20%iger Ammoniumsulfat-Lösung besprüht und 30 Minuten lang bei 200°C verascht. Dabei entspricht der Grad der Veraschung dem Lipidanteil der Bande. Nach der Veraschung wird die HPTLC-Platte in ein HPTLC-Platten Scanner (Camag, Muttenz, Schweiz) gelegt und die Absorption der individuellen Lipidbanden bei 450 nm densitometrisch gemessen.

### **2.5.9. Dünnschichtchromatographie der Lipidbande nach Extraktion aus dem Polyacrylamid-Gel**

Um das chromatographische Verhalten der Lipidbande aus dem Polyacrylamid-Gel (s. 2.2.2.2.) untersuchen zu können und mit dem chromatographischen Verhalten der extrahierten Lipide (s. 2.5.1.2.) vergleichen zu können, wird die Lipidbande an der Laufrichtung des Bromphenolblau (< 10 kD) aus dem Gel excidiert und die Lipide mit CM (2:1, v/v) aus dem Gel eluiert. Das Eluat wird im Stickstoff-Strom getrocknet, das Trockengewicht bestimmt und die Trockensubstanz in CM (2:1, v/v; etwa 6-8 µl/ml) aufgenommen. Diese Probe wird auf eine HPTLC-Platte im Ventilator-Luftstrom aufgetragen und wie beschrieben mit CMAEW



(65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) als Laufmittel chromatographiert (s. 2.5.4.1.). Nach der Auftrennung wird das chemische Verhalten der Lipidfraktionen überprüft und dokumentiert (s. 2.5.5.).

## **2.6. Strukturanalyse der Glykolipide**

Die gesamte Strukturanalytik der Kohlenhydrate der Lipide von *B. burgdorferi* B31 wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Geyer, unter Anleitung von Herrn Dr. Günter Lochnit, im Biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität zu Giessen durchgeführt.

### **2.6.1. Bausteinanalyse der Kohlenhydrate**

Die Analyse der Kohlenhydratstrukturen im Gesamtlipid von *B. burgdorferi* erfolgt analog zu den Methylierungsanalysen (s. 2.6.2.). Dabei wird das Gesamtlipid zunächst hydrolysiert, reduziert und peracetyliert. Die erhaltenen Alditol-Acetate werden durch Gaschromatographie analysiert. Die Trennung erfolgt dabei in einer Quarz-Kapillarsäule mit chemisch gebundener Phase (DB-1 Säule, 0.25 mm ID, 60 m). Für die Detektion der Kohlenhydrate wird ein Flammenionisationsdetektor eingesetzt. Die Identifizierung der Kohlenhydrate erfolgt anhand der Retentionszeiten der Alditol-Acetate [73].

### **2.6.2. Methylierungsanalyse**

Methylierungsanalysen liefern Informationen über die Substitution der einzelnen Zuckerkomponenten eines Oligosaccharids. Hierzu werden die Hydroxylgruppen der Oligosaccharide in Methoxylgruppen überführt und Acetamido-Reste ggf. n-methyliert. Nach Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung fallen dann partiell methylierte Alditol-Acetate an, die O-Acetylgruppen tragen. Diese Produkte können dann durch Kapillar-Gaschromatographie unter Verwendung von Säulen unterschiedlicher Polarität anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert werden. Die Detektion erfolgt dann durch Massenfragmentographie nach chemischer Ionisation mit Ammoniak [73, 74, 75].

#### **2.6.2.1. Permethylierung**

Die extrahierten Glykolipide werden in Mikroreaktionsgefäße (300 µl, Zinser) überführt und lyophilisiert. Durch ein Septum wird zu den verschlossenen Proben wasserfreies Dimethylsulfoxid (Merck) gegeben und die Proben darin 90 Minuten im Ultraschallbad bei Raumtemperatur gelöst. Nach Zugabe von 50 µl Lithium-Dimethylsulfinylat-Lösung (2 M Butyllithium in Dimethylsulfoxid) und 90 Minuten Inkubation im Ultraschallbad bei Raumtemperatur werden die Proben auf -20°C abgekühlt. Die Permethylierung erfolgt durch Zugabe von 50 µl frisch destilliertem Methyljodid und 90 Minuten Inkubation bei

Raumtemperatur im Ultraschallbad [73-75, 100]. Danach werden die Proben mit 150  $\mu$ l Aqua dest. versetzt und auf Chromabond C18ec-Säulen aufgegeben (s. 2.5.2.), welche zuvor mit 5 ml Aqua dest., 5 ml Acetonitril, 5 ml Methanol und erneut 10 ml Aqua dest. äquilibriert worden war. Anschließend werden die Säulen mit 5 ml Aqua dest., 2 ml 15% Acetonitril, 2 ml 30% Acetonitril, 2 ml 100% Acetonitril und je 2 ml Chloroform und Methanol gespült, wobei die Glykolipide mit Chloroform und Methanol eluierten. Die Proben werden in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

#### **2.6.2.2. Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung**

Um die Methylzucker freizusetzen, werden die permethylierten Oligosaccharide durch Zugabe von 500  $\mu$ l 0.25 M Schwefelsäure in 85%iger Essigsäure (beide Merck) 16 Stunden bei 80°C hydrolysiert. Die Ansätze werden mit 550  $\mu$ l 0.5 M Natronlauge (Merck) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge bei 20°C getrocknet und zur Entfernung der restlichen Essigsäure noch zweimal in 500  $\mu$ l Aqua dest. aufgenommen und wieder eingedampft. Die so freigesetzten Methylzucker werden mit NaBH<sub>4</sub>-Lösung (Natriumborhydrid) reduziert. Hierzu werden die Proben in 500  $\mu$ l NaBH<sub>4</sub>-Lösung (300 mM) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe von 150  $\mu$ l 1 M Essigsäure werden die Ansätze in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Entfernung der Borsäure werden die Proben 3 mal jeweils in 2 ml Methanol (mit 1% Essigsäure) aufgenommen und im Stickstoff-Strom getrocknet. Danach werden die Proben mit 400  $\mu$ l Acetanhydrid und 400  $\mu$ l Pyridin versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur belassen, und anschließend im Stickstoff-Strom getrocknet. Die partiell methylierten Alditolacetate werden in 4 ml Dichlormethan aufgenommen und viermal mit 1 ml Aqua dest. gewaschen, wobei die wässrige Phase jeweils verworfen wird. Die organische Phase wird im Stickstoff-Strom getrocknet und in 50  $\mu$ l Dichlormethan aufgenommen.

#### **2.6.2.3. Kombinierte Gaschromatographie/Massenfragmentographie (GC/MS)**

Zur Identifizierung der Methylzuckerderivate werden die partiell methylierten Alditolacetate durch kombinierte Gaschromatographie/Massenfragmentographie (GC/MS) nach chemischer Ionisation mit Ammoniak anhand ihrer Pseudomolekülionen ( $[M+NH_4]^+$  und  $[M+H]^+$ ) nachgewiesen und quantifiziert. Die Identifizierung erfolgt mit Hilfe von Standards anhand ihrer Retentionszeiten. Als GC/MS-Gerät wird das Modell 4021 der Firma Finnigan MAT benutzt. Die Trennungen erfolgen unter Verwendung von Quarz-Kapillarsäulen mit chemisch gebundenen Phasen (DB1: 60 m, DB210: 30 m; ICT). Als Trägergas wurde Helium mit einem Druck von 30 kPa eingesetzt. Die Verdampfung erfolgt bei 260°C, wobei die Temperaturgradienten wie folgt sind: DB1: 1.2°C/min steigend von 130-200°C und dann

5°C/min steigend bis 250°C; DB210: 1.5°C/min steigend von 130-250°C. Die Pseudomolekülonen werden durch Einzelionenmessung erfaßt.

### 2.6.3. Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (LSIMS)

Bei der Liquid-Secondary-Ion-Mass-Spectrometry (LSIMS) werden Ionen aus der Gasphase ohne vorherige thermische Verdampfung der Probe erzeugt. Zunächst wird ein beschleunigter Strahl von Ionen auf eine die Probe enthaltende visköse Matrix gerichtet. Dabei werden durch die Kollision Moleküle der Matrix und der Probe in das Hochvakuum der Ionenquelle überführt und ein Teil dieser Moleküle ionisiert. Abhängig von der chemischen Zusammensetzung der Probe und der Matrix entstehen Pseudomolekülonen des Typs:  $[M+H]^+$ ,  $[M+Kation]^+$ ,  $[M-H]^-$  und  $[M+Anion]^-$ . Die entstehenden Spektren zeigen dabei pseudomolekulare Ionen von Matrix und Probe und auch ein chemisches Rauschen. Die Hintergrundionen werden sowohl von Matrix als auch von Probe geliefert. Um die Interpretation der Spektren zu erleichtern und die Empfindlichkeit zu erhöhen, werden die Proben im derivatisierten Zustand untersucht (z.B. Permethylierung von Glykolipiden). Permethylierte Proben fragmentieren sehr selektiv und limitiert und liefern somit Ionen, die leicht zugeordnet werden können, bei nur geringer Zunahme der Molekülmasse.

Die Messungen werden an einem doppelfokussierenden Hochfeld-Massenspektrometer MAT 900 (Finnigan MAT) durchgeführt. Die nativen Phospholipide werden auf eine Matrix aus Triethanolamin (Merck) pipettiert und in das Hochvakuum der Ionenquelle überführt. Die Ionisierung erfolgt dabei durch einen mit 23kV beschleunigten Cäsiumionen-Strahl, bei einem Emmissionstrom von 2 bis 3  $\mu A$  und einer Beschleunigungsspannung von 5kV für Sekundärionen. Für den Nachweis der Ionen wird ein Sekundärionen-Vervielfacher eingesetzt. Das Magnetfeld wird so gesteuert, daß die Registrierung der Ionen mit einem exponentiellen Zeitverlauf (30 s/Dekade) oder einem linearen Zeitverlauf (30 s/1000 Masseneinheiten) bezüglich Masse/Zeit ( $m/z$ ) erfolgt. Die Spektren der nativen Phospholipide werden im „positive-ion-mode“ ( $[M+H]^+$  bzw.  $[M+H+Na]^+$ ) aufgenommen.

### 2.6.4. Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF)

Mit der „Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight“ (MALDI-TOF) Massenspektrometrie kann man Lipide in geringsten Mengen untersuchen. Hierzu ist eine Derivatisierung der Proben nicht erforderlich, auch eine Mischung von Lipiden läßt sich mühelos untersuchen. Anhand der Spektren der Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  und  $[M+K]^+$  kann Rückschluß über die Molekülzusammensetzung gezogen werden.

Die Messungen werden an einem Vision 2000 (Finnigan MAT) im Linear- und Reflektorbetrieb durchgeführt. Die Ionen entstehen durch Beschuß mit einem Stickstofflaser der Wellenlänge 337 nm, wobei als Matrix Dihydroxybenzoesäure (DHB, 10 g/l in 0.1%iger wässriger Trifluoressigsäure; Sigma) verwendet wird. Zunächst wird 1 µl Matrix vorgelegt und die Glykolipide in 0.5 µl CMW (10:10:1, v/v/v) zugegeben. Nach Trocknen im kalten Luftstrom wird erneut 1 µl Matrixlösung aufgetragen und getrocknet. Die Massenkalisierung erfolgt anhand der  $[M+H]^+$ -Ionen von Angiotensin (1296.7 Da, Sigma) und DHB (155 Da, Sigma). Es werden sowohl Einzelspektren als auch Summenspektren aufgenommen.

### **2.6.5. Bestimmung der anomeren Konfiguration der Glykolipide**

Um die anomere Konfiguration des Kohlenhydratanteils des Glykolipids zu bestimmen ( $\alpha$  oder  $\beta$  gebunden), werden die Glykolipide zunächst peracetyliert (s. 2.6.5.1.) und anschließend mit Chromtrioxid oxidiert und somit zerstört. Bei der anschließenden Bausteinanalyse kann dann anhand der GC/MS eine Veränderung des Kohlenhydrates nachgewiesen werden. Bei  $\alpha$ -gebundenen Kohlenhydraten findet durch die Chromtrioxid-Oxidation kaum eine Zerstörung statt, während bei einer  $\beta$ -Verknüpfung der Zucker oxidiert wird und dies in der Bausteinanalyse festgestellt werden kann (s. 2.6.1.).

#### **2.6.5.1. Peracetylierung**

Die getrockneten Glykolipide werden mit 0.5 ml Essigsäure/Trifluoressigsäureanhydrid (1:2, v/v) aufgenommen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert [76]. Nach dem Trocknen im Stickstoff-Strom werden die Proben in 3 ml Chloroform aufgenommen und die organische Phase dreimal mit je 2 ml Aqua dest. gewaschen. Die peracetylierten Glykolipide werden im Stickstoff-Strom getrocknet.

#### **2.6.5.2. Chromtrioxid-Oxidation**

Die peracetylierten Proben werden in 100 µl Eisessig (Merck) aufgenommen, mit 10 mg Chromtrioxid (Merck) versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von je 300 µl Aqua dest. und Chloroform, wird die organische Phase dreimal mit je 300 µl Aqua dest. gewaschen und im Stickstoff-Strom getrocknet [77]. Anschließend erfolgt eine Bausteinanalyse mit nachfolgender GC/MS (2.6.1.ff).

### **2.6.6. Perjodat-Oxidation**

Bei der Perjodat-Oxidation wird der Kohlenhydratanteil der Glykolipide oxidiert und kann bei einer nachfolgenden immunologischen Färbung nicht mehr von spezifischen Antikörpern

nachgewiesen werden. Die Perjodat-Oxidation wird auf HPTLC-Platten durchgeführt. Hierzu werden die Lipide von *B. burgdorferi* B31 zunächst dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (s. 2.5.4.) und die HPTLC-Platte mit 0.5%iger Polymethylacrylat-Lösung in n-Hexan (Röhm&Haas) fixiert. Nach Trocknen im kalten Luftstrom wird die Platte 10 Minuten mit 100 mM Natriumacetat (Merck) pH 5.5 inkubiert. Die Perjodat-Oxidation erfolgt dann mit 20 mM Natriummetaperjodat (Merck) in 100 mM Natriumacetat pH 5.5 für eine Stunde bei 37°C im Dunkeln. Die Oxidation wird gestoppt durch dreimaliges Waschen der Platte mit Natriumacetat-Lösung. Anschließend wird die HPTLC-Platte wie beschrieben immunologisch gefärbt (s. 2.5.6.). Vorausgesetzt die Antikörper gegen die Glykolipide binden spezifisch an die Galaktose, dürfte nach der Zerstörung der Galaktose durch die Perjodat-Oxidation keine spezifische Antikörperbindung an die Galaktose mehr stattfinden. Die immunologische Färbung müsste negativ ausfallen.

### 2.6.7. Fettsäure-Analyse

Um Fettsäure-Gemische gaschromatographisch trennen zu können, muß zunächst eine Derivatisierung der Carboxyl-Gruppe erfolgen. Dies geschieht durch Bildung von Fettsäuremethylestern. Die anschließende Strukturanalyse der Fettsäure-Derivate erfolgt mittels kombinierter Gaschromatographie/Massenspektrometrie. Strukturelle Informationen erhält man aus Spektren nach Elektronenstoßionisierung (EI), die Ionisierung erfolgt dabei durch einen Elektronenstrahl, wobei die Beschleunigungsenergie der Elektronen etwa 70 eV beträgt. Durch die Ionisierung entstehen Molekülonen  $[M]^+$  und charakteristische Fragmentationen, die wichtige strukturelle Informationen liefern. Bei der Fettsäure-Analyse steht neben der Ermittlung von Molekülmassen auch die Lokalisation der Doppelbindungen, Hydroxyl- und Methylgruppen im Mittelpunkt.

#### 2.6.7.1. Hydrolyse der Glykolipide nach Gaver und Sweeley

Die Hydrolyse dient der Freisetzung der Fettsäuren aus den Glykolipiden. Hierzu wird eine Glykolipid-Probe 16 Stunden in 0.5 ml frisch angesetzter Hydrolyse-Lösung (1 M HCl in Methanol, 10 M Aqua dest.) bei 100°C inkubiert [78]. Nach Beendigung der sauren Hydrolyse lassen sich die freigesetzten Fettsäuren durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml n-Hexan (Merck) extrahieren und im Stickstoff-Strom trocknen.

#### 2.6.7.2. Herstellung von Methylestern

Die getrockneten Fettsäuren werden mit 100 µl  $\text{BF}_3$ /Methanol Reagenz (Sigma) versetzt und 60 Minuten bei 60°C inkubiert.

### 2.6.7.3. Acetylierung von Hydroxyfettsäuremethylestern

Zur Acetylierung werden die Hydroxyfettsäuremethylester 16 Stunden mit 600 µl Pyridin/Essigsäureanhydrid (1:1, v/v) bei 25°C inkubiert und im Stickstoff-Strom getrocknet.

### 2.6.7.4. GC/MS der Fettsäuremethylester

Die Fettsäuremethylester lassen sich mit der kombinierten Gaschromatographie /Massenfragmentographie (GC/MS) nach chemischer Ionisation mit Ammoniak anhand ihrer Pseudomolekülonen  $[M+NH_4]^+$  nachweisen und quantifizieren. Die Identifizierung erfolgt dabei anhand der Retentionszeiten von Standards. Als GC/MS-Gerät wird das Modell 4021 der Firma Finnigan MAT verwendet. Die Trennungen erfolgen an einer Quarz-Kapillarsäule mit chemisch gebundener Phase (OV-1701, 0.25 mm, 60 m; ICT). Die Temperatur der Kapillar-Säule wird von 80°C bis 320°C erhöht und 10 Minuten bei 320°C gehalten. Der Temperaturgradient beträgt 7°C/min. Die Ionisierung erfolgt bei einem  $NH_3$ -Quellendruck von 33 Pa [75].

## 2.7. Dot-Blot-Analyse der *B. burgdorferi* B31-Phospholipide

In der Diagnostik der Syphilis dient der „Veneral Disease Research Laboratory“-Test (VDRL) der Verlaufskontrolle nach antibiotischer Therapie [209-213]. Als Antigen dient dabei Cardiolipin, welches mit Cholesterin und Phosphatidylcholin complexiert eine stärkere Antigenität zeigt als uncomplexiertes Cardiolipin. Analog zum VDRL-Test soll geprüft werden, ob eine Komplexierung der Borrelien-Phospholipide mit Cholesterin und Phosphatidylcholin eine Verstärkung der Antigenität zeigt. Hierzu werden die Phospholipide von *B. burgdorferi* B31 nach der Trennung mittels Dünnschichtchromatographie (s. 2.5.4.) von der HPTLC-Platte gekratzt und mit CM (2:1, v/v) eluiert. Nach dem Trocknen im Stickstoff-Strom werden die Phospholipide in Ethanol aufgenommen. Zusätzlich werden folgende Lösungen in Ethanol hergestellt:

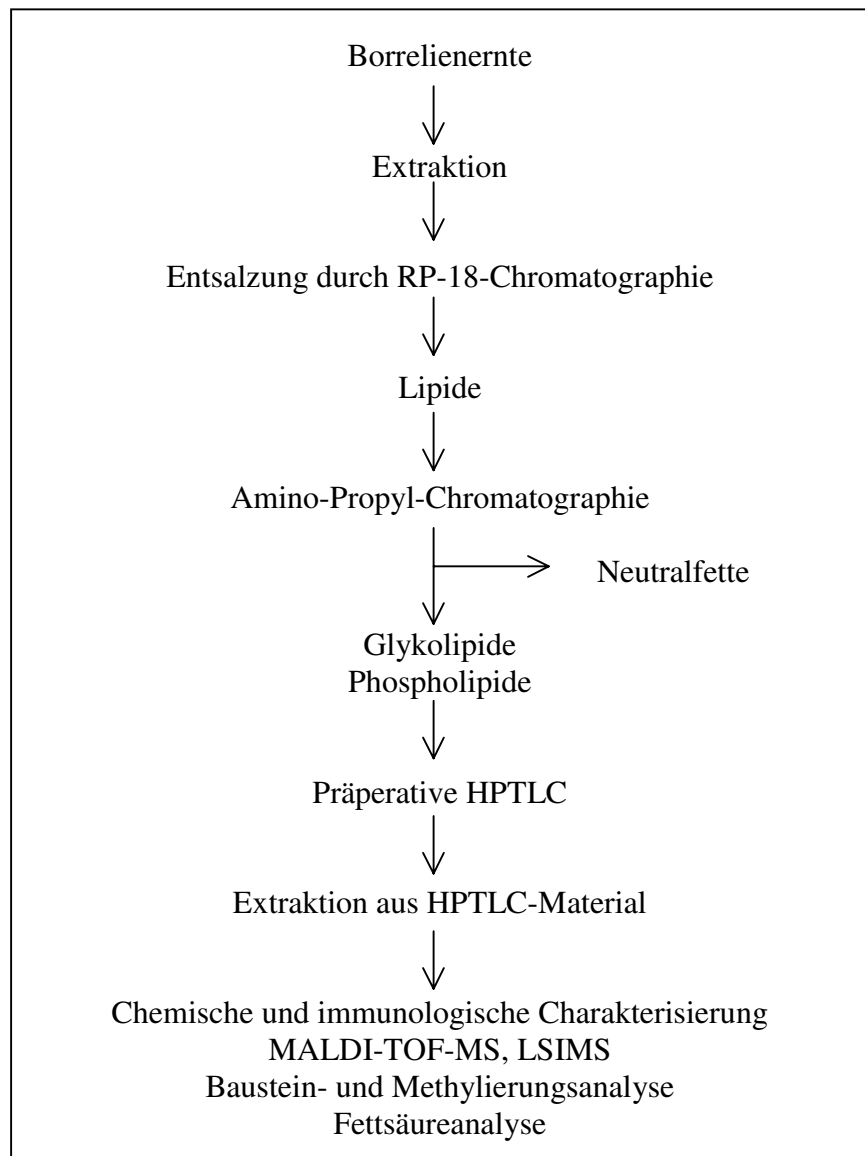
- a) 0.09% Cholesterin (Sigma)
- b) 0.021% Phosphatidylcholin (Sigma)
- c) *B. burgdorferi* B31-Gesamtlipid
- d) 0.003% Cardiolipin (Sigma)
- e) 0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin
- f) 0.003% Phospholipid Bolip2
- g) 0.003% Phospholipid Bolip3
- h) 0.003% Bolip2 + 0.003% Bolip3
- i) 0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip2

- j) 0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip3
- k) 0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip2 + 0.003% Bolip3
- l) 0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Cardiolipin

Für die Herstellung der Komplexe werden ethanolisches Cholesterin und Phosphatidylcholin zusammengemischt und die ethanolischen Borrelienphospholipide bzw. Cardiolipin vorsichtig in diese Lösung injiziert. Danach wird das Gemisch aus Cholesterin, Phosphatidylcholin und Phospholipiden in einem Rotationsverdampfer abrotiert und erneut in einer definierten Menge Ethanol aufgenommen. Für die Dot-Blot-Analyse werden auf einem Immobilon-Streifen jeweils 1 µl der dieser Lösungen pipettiert und im kalten Luftstrom getrocknet. Danach wird der Streifen zwei Stunden mit Blot-Blockierungspuffer (10%iges fetales Kälberserum in 0.1 M EDTA, pH 7.5, s.2.2.2.1.e) bei 4°C inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Blockieren wird der Immobilon-Streifen 2 Stunden mit Patientenserum (verdünnt 1:100 in Blot-Blockierungspuffer ) bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch fünfmaliges Waschen mit je 5 ml PBS, pH 7.2 (s. 2.1.2.1.) entfernt. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Peroxidase-markierten Kaninchen Anti-Human IgG Antikörper (s. 2.2.2.1.j., verdünnt 1:1000 in Blot-Blockierungspuffer) für 2 Stunden bei 4°C. Nach der Inkubation mit dem Zweit-Antikörper wird erneut 5 mal mit je 5 ml PBS gewaschen, um nicht gebundene Zweit-Antikörper zu eliminieren. Anschließend erfolgt die Färbung mit der Entwickler-Lösung (Substrat, s.2.2.2.1.1.) bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Die Färbung dauert 10-20 Minuten und wird durch Waschen mit PBS gestoppt.

### 3. Ergebnisse

Die *B. burgdorferi* Proben wurden nach folgendem Schema analysiert (Abbildung 14):



**Abb.14 Vorgehensweise bei der Analyse der Borrelienlipide**

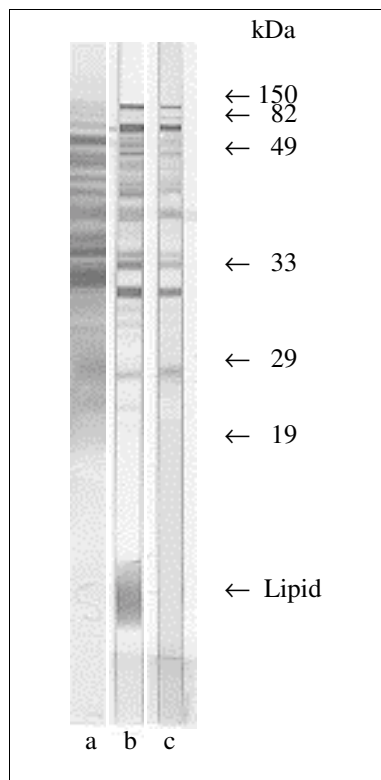
#### 3.1. Nachweis der Antigene von *B. burgdorferi* mittels SDS-PAGE und Immunoblotting

Nach der Kultivierung und Ernte von *B. burgdorferi* B31, wurde die Bakteriensuspension lyophilisiert und das Trockengewicht bestimmt (s. 2.1.2.1.). Die Antigene von *B. burgdorferi* B31 wurden mittels SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennt (s. 2.2.2.2.), auf eine Membran übertragen (s.2.2.3.2.) und mit Proteinfarbstoffen gefärbt (2.2.3.3.). Anschließend erfolgte ein Immunoblotting mit Patientenserum (s. 2.2.3.4.).

Zur Darstellung der erfolgreichen Auftrennung in der SDS-PAGE wurde ein Gelstück mit Coomassie-Blau gefärbt. Mit Coomassie-Blau ließen sich die proteinhaltigen Partialantigene



von *B. burgdorferi* darstellen. Nach dem Transfer der Antigene auf eine Immobilonmembran, wurde ein Blotstreifen mit Amidoschwarz gefärbt. Dabei ließen sich erneut die Proteinantigene darstellen. Im anschließenden Immunoblotting mit Serum von Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium II (s. 2.4.) reagierten die Antikörper des Patienten mit einer Vielzahl von *B. burgdorferi*-Partialantigenen, vor allem mit den Proteinbanden, aber auch mit einer Bande bei  $< 10$  kDa. Die gebundenen humanen Antikörper wurden durch die Verwendung eines peroxidase-markierten Antihuman-IgG-Immunglobulins sichtbar gemacht. Die Bande bei  $< 10$  kDa lief oberhalb der Lauffront des Bromphenolblau und konnte nicht mit den Proteinfarbstoffen Coomassie-Blau und Amidoschwarz gefärbt werden (Abb. 15). Darstellbar war diese Bande nur im Immunoblot nach Inkubation mit Seren von Lyme-Borreliose Patienten. Anscheinend handelte es sich bei dieser Bande nicht um Proteinantigen, sondern um ein Lipidantigen. Dies belegte auch die Chloroform-Löslichkeit dieser Bande. Wurden die Blotstreifen nach dem Transfer (Blotting) mit Chloroform/Methanol (1:1, v/v) behandelt, war im anschließenden Immunoblotting die Lipidbande nicht mehr darstellbar, obwohl die Proteinbanden noch vorhanden waren (Abb. 15). Dieses Ergebnis sprach für ein Lipid und erhärtete den Verdacht, daß es sich bei der Bande um ein Lipidantigen handelt. Die Isolierung und Charakterisierung dieses Lipidantigens ist Hauptbestandteil dieser Studie.



**Abb. 15 Darstellung der Lipidbande im Blot**

Westernblot nach SDS-PAGE mit *B. burgdorferi*-Lysat als Antigen

a = Amidoschwarz    b = IgG-Blot vom Patienten mit Borreliose Stadium II vor Methanolbehandlung

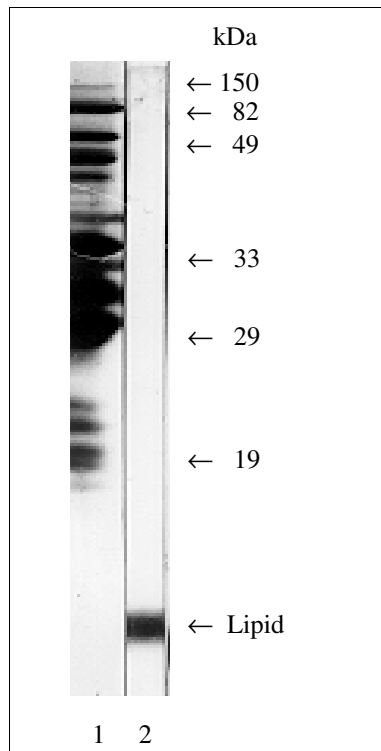
c = Gleicher Blot nach Methanolbehandlung; Proteinbanden sind noch vorhanden, Lipidbande ist verschwunden

### 3.2. Isolierung der Lipide von *B. burgdorferi*

Nach der Kultivierung und Ernte von *B. burgdorferi* B31 wurde die Bakteriensuspension lyophilisiert und das Trockengewicht bestimmt (s. 2.1.2.1.). Die Lipide wurden extrahiert nach einer modifizierten Methode nach Bligh&Dyer (s. 2.5.1.2.) [64]. Nach der Extraktion erhält man eine biphasische Lösung mit einer oberen hydrophilen Methanol-Wasser-Phase (MP) und einer unteren lipophilen Chloroform-Phase (CP). Beide Phasen wurden vorsichtig abpipettiert, im Rotationsverdampfer abrotiert und das Trockengewicht bestimmt. Die extrahierten Lipide der Chloroform-Phase betrugen etwa 25 – 30% des gesamten Zell Trockengewichtes der Borrelien. Das ist ein hoher Lipidanteil im Vergleich zu anderen gramnegativen Bakterien.

### 3.3. SDS-PAGE und Immunoblotting der extrahierten Lipide

Zur Untersuchung des immunologischen Verhaltens der Lipide nach Extraktion (s. 2.5.1.2.) wurde nach Extraktion die hydrophile Methanol-Phase (Proteine) und die lipophile Chloroform-Phase (Lipide) im Stickstoff-Strom getrocknet, das Trockengewicht der jeweiligen Phase bestimmt und die Trockensubstanzen als Antigene in die SDS-PAGE eingesetzt (s. 2.2.2.2.). Nach der SDS-PAGE wurde wie beschrieben ein Western-Blotting durchgeführt (s. 2.2.3.2.), als Kontroll-Serum wurde Serum von Patienten mit Borreliose Stadium II eingesetzt (s. 2.4.). Der Western-Blot der hydrophilen Methanol-Phase zeigte nur die Protein-Antigene von *B. burgdorferi* B31, das Lipidantigen wurde nicht dargestellt. Der Western-Blot der lipophilen Chloroform-Phase dagegen zeigte nur das Lipid-Antigene bei < 10 kDa, während die Proteine nicht dargestellt wurden. Dieses Ergebnis verdeutlicht einerseits die erfolgreiche und vollständige Extraktion der Lipide aus der Borreliensuspension und andererseits die unverändert vorhandene Immunogenität des Lipidantigens auch nach Chloroform-Methanol-Behandlung (Abb. 16).



**Abb. 16 Darstellung der Lipidbande im Blot nach erfolgreicher Lipidextraktion**

Westernblot nach SDS-PAGE mit *B.burgdorferi*-Lysat als Antigen und Serum Borreliose III

1= Methanol/Wasser-Phase 2= Chloroformphase

### 3.4. Dünnschichtchromatographie der Lipide

Vor der Dünnschichtchromatographie (s. 2.5.4.) wurden die Lipide mittels RP-Chromatographie entsalzt und aufgereinigt (s. 2.5.2.). Die gereinigten Lipide wurden in Linien auf die HPTLC-Platten aufgetragen und mit verschiedenen Laufmitteln chromatographiert (s. 2.5.4.1.). Die beste Auftrennung der Lipide gelang mit Chloroform/Methanol/Aceton/Essigsäure/Wasser (CMAEW, 65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) als Laufmittel. Die Chromatographie mit diesem Laufmittel ergab 11 verschiedene Fraktionen, die alle mit Jod anfärbbar waren. Die 11 Fraktionen wurden als Bolip 1 – 11 (Borrelienlipid 1 – 11) bezeichnet. Nach der Chromatographie wurde die relative Laufstrecke (RF-Wert) der 11 verschiedenen Fraktionen bestimmt (Abb. 17, Tabelle 2).

RF-Wert	Lipidbezeichnung		Lipidfraktionen Bolip
0.03	BOLIP 1		11
0.09	BOLIP 2		10
0.21	BOLIP 3		9
0.30	BOLIP 4		8
0.43	BOLIP 5		7
0.48	BOLIP 6		6
0.55	BOLIP 7		5
0.61	BOLIP 8		4
0.71	BOLIP 9		3
0.80	BOLIP 10		2
0.89	BOLIP 11		1



**Abb. 17 HPTLC der Borrelienlipide**

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde auf HPTLC-Platten aufgetragen und mit CMAEW (65:10:20:10:3, , v/v/v/v/v) entwickelt. Die Detektion erfolgte mit Joddampf

**Tab. 2 Relative Laufstrecken (RF-Werte) der Lipidfraktionen von *B. burgdorferi***

### 3.5. Chemische Färbung der Lipidfraktionen

#### a) Jod-Färbung

Zunächst wurde die chromatographierte HPTLC-Platte mit Jod gefärbt (s. 2.5.5.), dabei ließen sich 11 Banden darstellen. Die Jod-Färbung färbt Lipide unspezifisch und zerstörungsfrei an. Nach der Färbung läßt sich das Jod wieder mühelos unter einem Ventilator-Luftstrom entfernen und die HPTLC-Platte steht weiteren Färbungen zur Verfügung.

#### b) Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Färbung

Mit Orcinol-Färbung lassen sich Kohlenhydratstrukturen gut darstellen (s. 2.5.5.). Im Falle der chromatographierten Borrelienlipide ließen sich von den 11 Fraktionen nur 2 mit Orcinol darstellen, Bolip 7 und 8. Die restlichen Fraktionen zeigten keine Reaktion mit dem Orcinol, sodaß man behaupten kann, daß Bolip 7 und 8 die einzigen Glykolipide von *B. burgdorferi* sind.

### c) Ninhydrin-Färbung

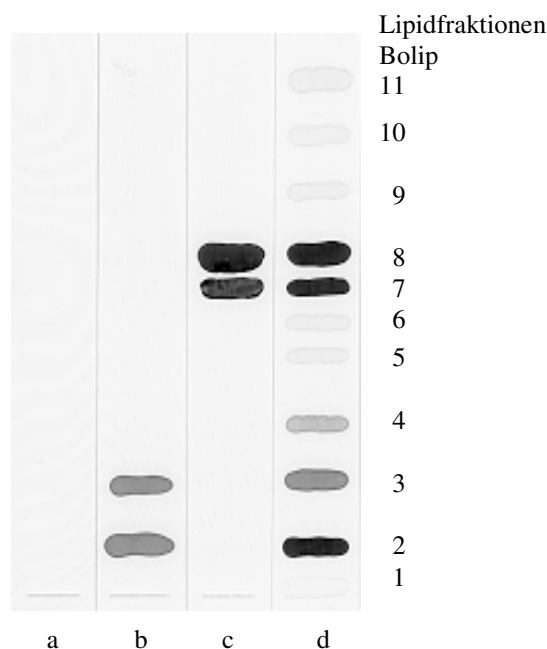
Mit dem Ninhydrin-Reagenz lassen sich primäre Aminogruppen detektieren (s. 2.5.5.). Die Ninhydrin-Färbung zeigte keine Reaktionen mit den Lipidfraktionen (Abb. 18). Somit kann man die Anwesenheit von freien Aminogruppen bei den 11 Lipidfraktionen von *B. burgdorferi* ausschließen.

### d) Phosphat-Färbung

Mit der Phosphat-Färbung nach Dittmer und Lester [71] lassen sich Phosphatgruppen darstellen (s. 2.5.5.). Von den aufgetrennten Borrelienlipiden ließen sich nur 2 Fraktionen mit dem Phosphat-Reagenz darstellen, Fraktion Bolip 2 und 3 (Abb. 18). Somit besitzt *B. burgdorferi* außer 2 Glykolipiden, Bolip 7 und 8, zusätzlich noch 2 Phospholipide, Bolip 2 und 3.

### e) Ammoniumsulfat-Veraschung

Mit dieser Methode lassen sich alle Lipidbanden darstellen. Sie werden für die anschließende Quantifizierung verascht. Nach der Veraschung werden die relativen Lipidanteile densitometrisch bestimmt.



### Abb. 18 Chemische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi*

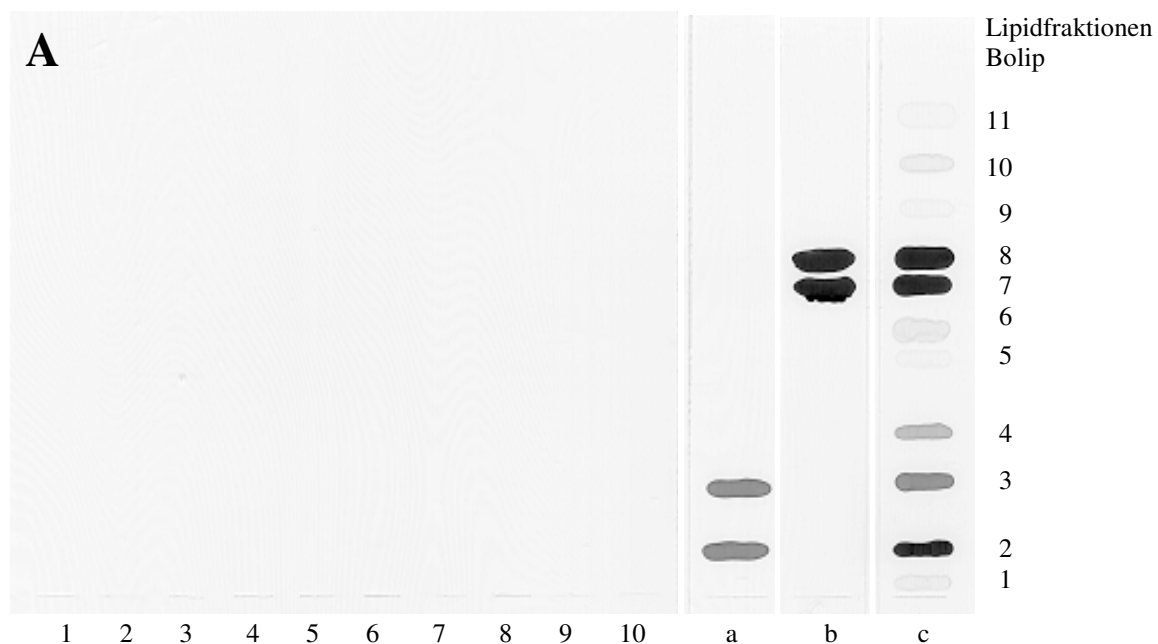
Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde auf HPTLC-Platten aufgetragen und mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) entwickelt. Die Detektion erfolgte mit folgenden Nachweisreagenzien:

- a. Ninhydrin-Färbung (Aminogruppen); b. Phosphat-Färbung (Phosphatgruppen); c. Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Färbung (Kohlenhydrate); d. Ammoniumsulfat-Veraschung

### 3.6. Immunologische Färbung

Die Immunfärbungen wurden analog zum Western-Blotting nach einer beschriebenen Methode [72] direkt auf der HPTLC-Platte durchgeführt (s. 2.5.6.). Die eingesetzten Patientenseren sind in Materialien und Methoden 2.4. beschrieben. Alle Seren wurden auf eine IgG-Konzentration von 8 mg/ml eingestellt, um die Seren miteinander vergleichen zu können. Die Bindung der humanen IgG-Antikörper an die Lipidfraktionen wurde durch die Verwendung eines peroxidase-markierten Antihuman-IgG-Immunglobulins sichtbar gemacht (Abb. 19A-E).

- a) 10 Seren von gesunden Blutspendern (Negativ-Kontrolle; Elisa-Grenzwert < 0.6 und keine spezifischen Banden im Borrelien- oder Treponemen-Western-Blot):  
Keiner der 10 Seren reagierte mit den 11 Lipidfraktionen (Abb. 19A).



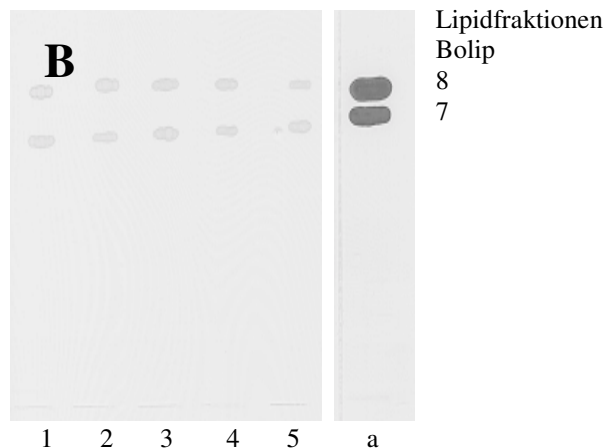
**Abb. 19A. Immunologische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi***

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) dünnstschichtchromatographisch aufgetrennt. Die chemische Detektion erfolgte mit Phosphat-Färbung (a), Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b) und Ammoniumsulfat-Veraschung (c).

Die immunologische Detektion wurde mit 10 Seren von gesunden Patienten (Blutspender) ohne Lyme-Borreliose (1-10) durchgeführt (jeweils Serumverdünnung 1:100), als Zweitantikörper dienten Antihuman-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:1000).

- b) 5 Seren von Patienten mit Borreliose Stadium I (ECM, unspezifische Allgemeinsymptome; Elisa-Grenzwert um 1, schwache spezifische Proteinbanden im IgM-Borrelia-Blot, schwache Lipidbande im IgM-Blot):

Schwache Anfärbung der beiden Glykolipide, Bolip 7 und 8. Sonst keine Fraktion angefärbt (Abb. 19B).

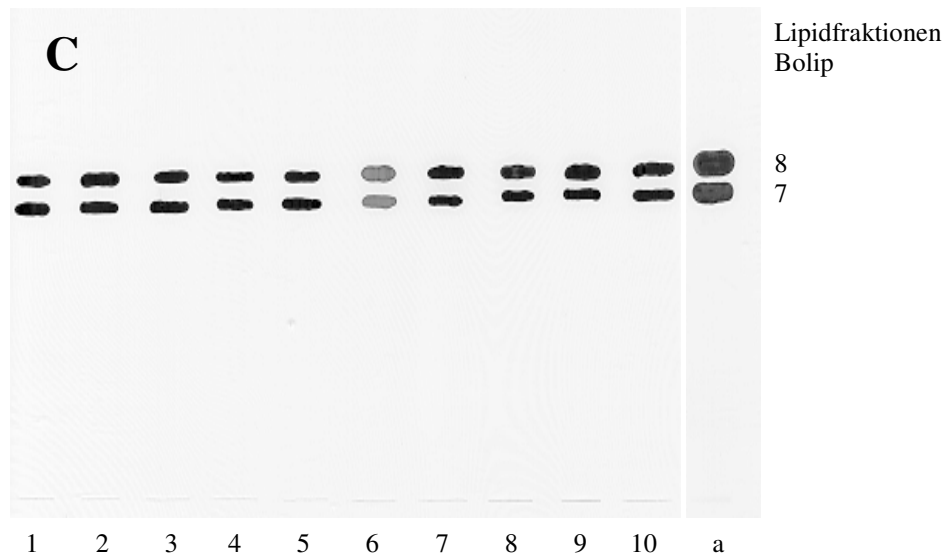


**Abb. 19B Immunologische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi***

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) dünnsschichtchromatographisch aufgetrennt. Die chemische Detektion erfolgte mit Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (a). Der Immunoblot wurde mit 5 Seren (1-5) von Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium I durchgeführt (jeweils Serumverdünnung 1:100)

- c) 10 Seren von Patienten mit Borreliose Stadium II (neurologische Manifestation, Arthritis; Elisa-Grenzwert um 1.5, starke spezifische Proteinbanden und Lipidbande im IgM- und IgG-Borrelia-Blot):

Starke Anfärbung der beiden Glykolipide, Bolip 7 und 8. Die restlichen Fraktionen zeigten keine Anfärbung (Abb. 19C).



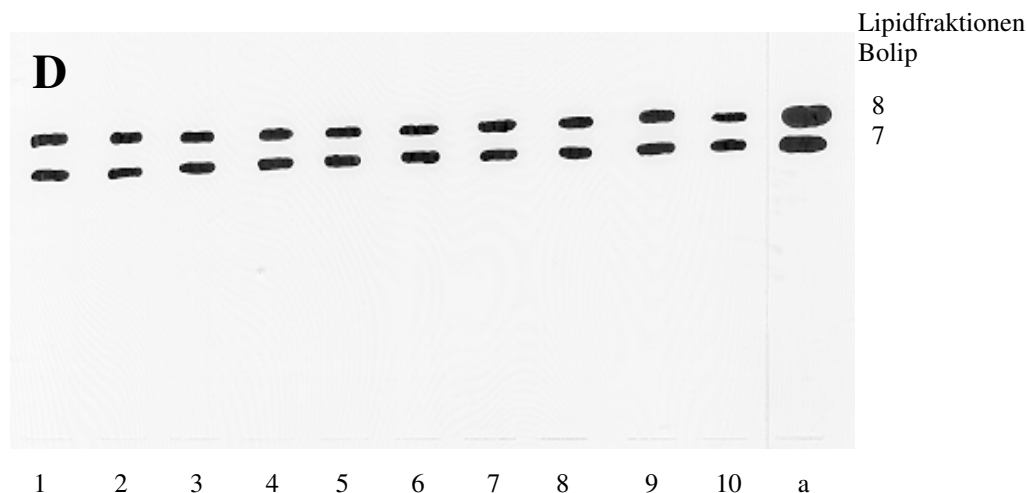
**Abb. 19C Immunologische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi***

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) chromatographiert. Die chemische Detektion erfolgte mit Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (a).

Der Immunoblot wurde mit 10 Seren (1-10) von Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium II durchgeführt (Serumverdünnung 1:100)

- d) 10 Seren von Patienten mit Borreliose Stadium III (Enzephalitis, ACA; Elisa-Grenzwert um 1.3, schwache spezifische Proteinbanden und Lipidbande im IgM-Borrelien-Blot, starke spezifische Proteinbanden und Lipidbande im IgG-Borrelien-Blot)

Erneut starke Anfärbung der beiden Glykolipide, Bolip 7 und 8; keine weitere Anfärbung (Abb. 19D).



**Abb. 19D Immunologische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi***

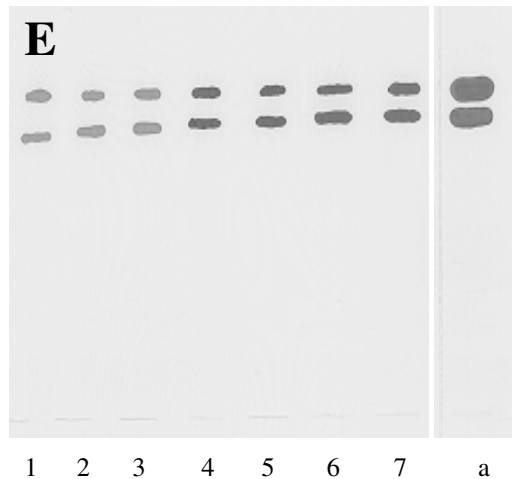
Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) chromatographisch aufgetrennt. Die chemische Detektion erfolgte mit Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (a).

Der Immunoblot wurde mit 10 Seren (1-10) von Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium III durchgeführt (Serumverdünnung 1:100)



- e) 10 Seren von Patienten mit einer abgelaufenen Borreliose nach Therapie (Serumnarbe, keine Krankheitszeichen; Elisa-Grenzwert um 0.9, nur spezifische Proteinbanden und Lipidbande im IgG-Borrelien-Blot):

Mäßige Darstellung der Glykolipide, Bolip 7 und 8, sonst keine Anfärbung (Abb. 19E).



**Abb. 19E Immunologische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi***

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) chromatographisch aufgetrennt. Die chemische Detektion erfolgte mit Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (a).

Der Immunoblot wurde mit 7 Seren (1-7) von Patienten mit abgelaufener Lyme-Borreliose (Serumnarbe) durchgeführt (Serumverdünnung 1:100)

- f) 10 Seren von Patienten mit einer Syphilis im Sekundär- oder Tertiär-Stadium (syphilitische Hauterkrankungen, Neurosyphilis; spezifische Banden im IgM- und IgG-Treponemen-Blot, im Borrelienblot schwache Darstellung uncharakteristischer Proteinbanden durch kreuzreagierende Antikörper, keine Darstellung der Lipidbande)  
Mit den Seren von Patienten mit Syphilis ließen sich keine der 11 Lipidfraktionen von *B. burgdorferi* darstellen .

Die immunologischen Untersuchungen der Borrelienlipide zeigte deutlich, daß nur 2 von 11 Fraktionen Antikörper von Lyme-Borreliose Patienten binden. Es sind die Fraktionen Bolip 7 und 8, welche gleichzeitig auch die einzigen Glykolipide von *B. burgdorferi* sind. Weder die Phospholipide, Bolip 2 und 3, noch die restlichen Lipidfraktionen zeigten eine Antikörperbindung. Die Seren der Lyme-Borreliose Patienten im Stadium I zeigten eine schwache Färbung der Glykolipide, entsprechend der schwachen Darstellung der Lipidbande im Immunoblot. Die Seren des Stadiums II, III und der Patienten nach abgelaufener Borreliose zeigten dagegen eine starke Darstellung der Glykolipide, dies entsprach auch der

Darstellung der Lipidbande im Immunoblot. Sowohl die Seren von gesunden Blutspendern als auch die Seren von Syphilis-Patienten zeigten keine unspezifische Anfärbung der Lipidfraktionen. Während die Proteinantigene von *T. pallidum* und *B. burgdorferi* oft miteinander kreuzreagieren, scheinen die immunogenen Glykolipide von *B. burgdorferi* keine Kreuzantigenität mit *T. pallidum* zu besitzen und somit spezifisch für *B. burgdorferi* zu sein.

### 3.7. SDS-PAGE und Western-Blotting der chromatographierten Lipid-Fractionen

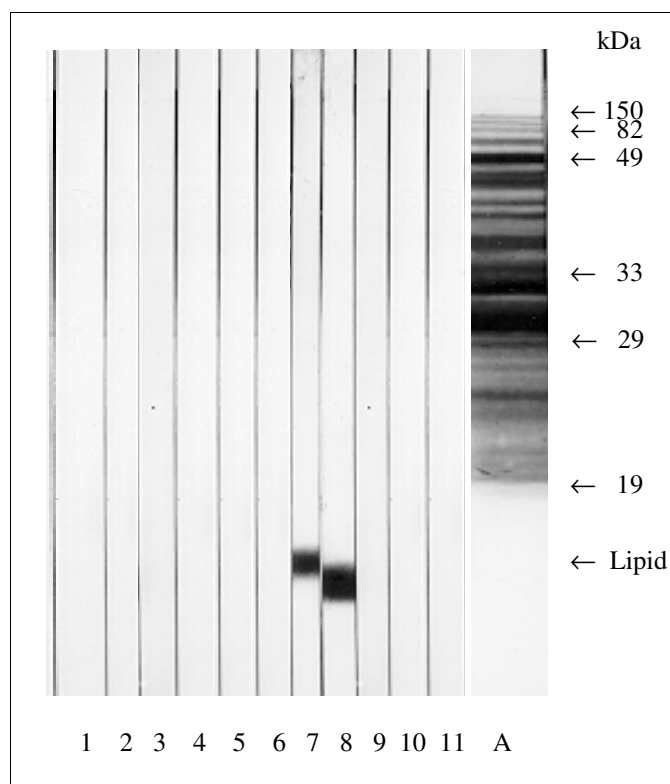
Um das immunologische Verhalten der 11 einzelnen Lipidfraktionen im Western-Blot zu überprüfen, wurden die Lipidfraktionen nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung einzeln von der HPTLC-Platte herausgekratzt und mit CM (2:1, v/v) aus dem Kieselgel eluiert. Nach Trocknen im Stickstoff-Strom und Bestimmung des Trockengewichtes, wurden die einzelnen Lipidfraktionen als Antigene in eine SDS-PAGE mit Kammern eingesetzt (s. 2.5.7.2.). Nach der SDS-PAGE wurden die Lipidantigene auf eine Immobilonmembran übertragen (s. 2.2.3.2.) und anschließend ein Immunoblotting mit Serum von Patienten mit Borreliose Stadium II durchgeführt (2.4.). Wie auch im Immuno-HPTLC reagierten nur die beiden Glykolipide Bolip 7 und 8 mit dem Patientenserum, während die Phospholipide und die restlichen Fraktionen keinerlei Reaktion mit dem Patientenserum zeigten (Abb. 20). Es wurde auch deutlich, daß die beiden Glykolipide in der SDS-PAGE dieselbe Laufhöhe aufwiesen wie das Gesamtlipid (< 10 kDa).

### 3.8. Dünnschichtchromatographie der Lipidbande nach Extraktion aus dem Polyacrylamid-Gel

Das chromatographische Verhalten der Lipidbande aus dem Polyacrylamid-Gel wurde untersucht und mit dem chromatographischen Verhalten der Gesamtlipide verglichen. Dabei wurde die Lipidbande an der Laufront des Bromphenolblau (< 10 kD) aus dem Gel excisiert und mit CM (2:1, v/v) aus dem Gel eluiert. Das Eluat wurde wie beschrieben (s. 2.5.9.) auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) als Laufmittel chromatographiert (s. 2.5.4.1.). Nach der Auftrennung wurde das chemische Verhalten der Lipidfraktionen überprüft (s. 2.5.5.).

Bei dieser Untersuchung zeigte sich, daß die aus dem Gel extrahierte Lipidbande sich dünnschichtchromatographisch in 11 unterschiedliche Fraktionen auftrennen läßt. Die relativen Laufstrecken der Fraktionen sind identisch mit denen des chromatographierten Gesamtlipides. Auch die chemischen Färbungen sind identisch mit denen des *B. burgdorferi* Gesamtlipides, es lassen sich erneut 2 Glykolipide und 2 Phospholipide darstellen. Mit anderen Worten, die antigene Lipidbande an der Laufront von Bromthymolblau ist das

extrahierbare Gesamtlipid von *B. burgdorferi* und besteht aus 11 verschiedenen Fraktionen, wobei nur die beiden Glykolipide immunogen sind (Abb. 21).

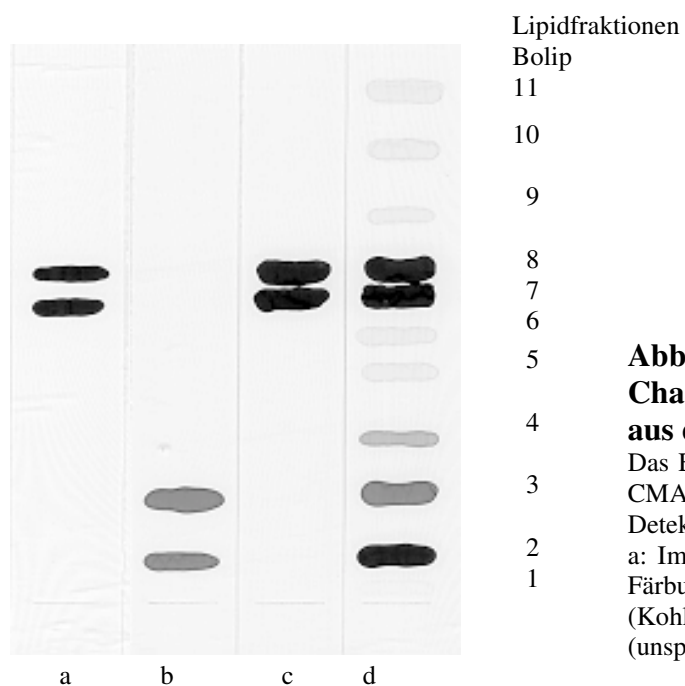


**Abb. 20 SDS-PAGE der chromatographierten Lipidfraktionen**

Nach SDS-PAGE mit den 11 Lipidfraktionen von *B. burgdorferi* als Antigen, erfolgte ein Westernblot mit Serum vom Patienten mit Borreliose Stadium II.

1-11= Lipidfraktionen Bolip 1-11 von *B. burgdorferi*

A = Amidoschwarz



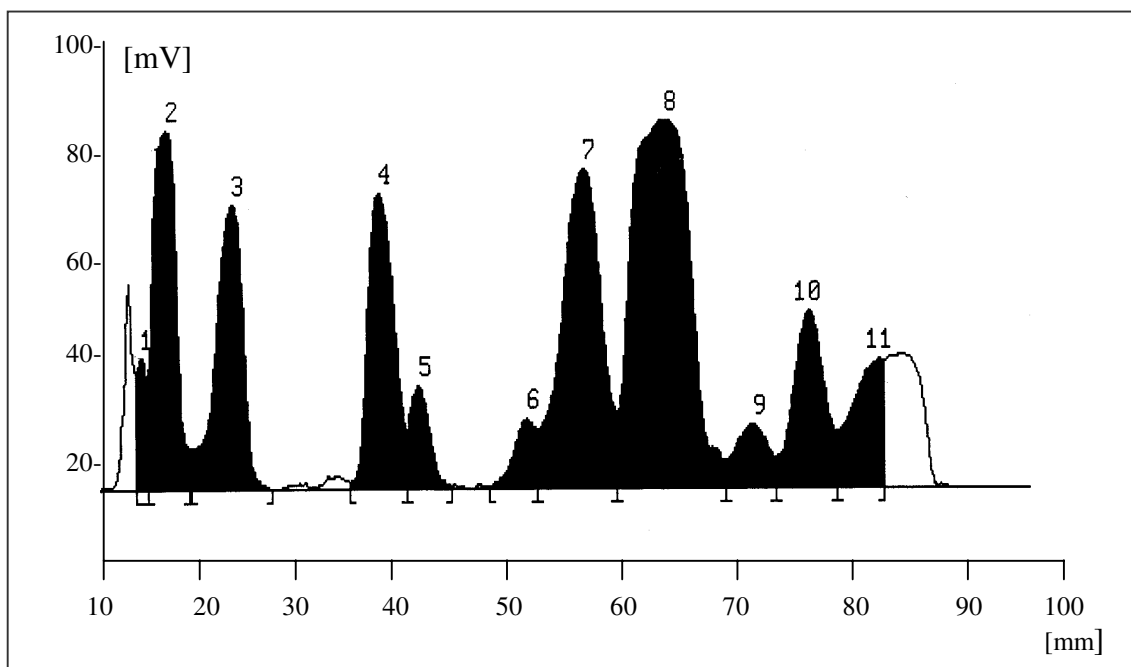
**Abb. 21 Chemische und immunologische Charakterisierung der eluierten Lipidbande aus dem Polyacrylamid-Gel**

Das Eluat wurde auf HPTLC-Platten aufgetragen und mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) entwickelt. Die Detektion erfolgte mit folgenden Nachweisreagenzien:

a: Immunoblot mit Borreliose St. II Serum; b: Phosphat-Färbung (Phosphatgruppen); c: Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Färbung (Kohlenhydrate); d: Ammoniumsulfat-Färbung (unspezifische Lipidfärbung)

### 3.9. Bestimmung der relativen Lipidanteile

Die chromatographierte HPTLC-Platte wurde mit 20%iger Ammoniumsulfat-Lösung besprüht und 30 Minuten lang bei 200°C verascht (s. 2.5.5.). Dabei entspricht der Grad der Veraschung dem Lipidanteil der Bande. Nach der Veraschung wurde die Absorption der individuellen Lipidbanden mittels eines HPTLC-Platten Scanner (Camag, Muttensz, Schweiz) densitometrisch bei 450 nm gemessen (s. 2.5.8.). Die relativen Anteile sind in der Tab. 2 und Abb. 22 aufgeführt. Das Glykolipid Bolip 8 hat den größten Anteil am Gesamtlipid von *B. burgdorferi* (etwa 30%), das Glykolipid Bolip 7 den zweitgrößten Anteil (17%), gefolgt von den beiden Phospholipiden Bolip 2 (11%) und Bolip 3 (10%). Interessanterweise machen die einzigen immunogenen Lipidfraktionen von *B. burgdorferi*, die beiden Glykolipide Bolip 7 und 8, zusammen etwa 50% der Gesamtlipide aus.



**Abb. 22 Densitometrische Quantifizierung der Lipide von *B. burgdorferi***

Die durch HPTLC aufgetrennten Lipide wurden mit Ammoniumsulfat besprüht, verascht und die einzelnen Banden densitometrisch vermessen (s. Tab. 3).

RF-Werte	Lipidbezeichnung	Relative Menge [%]
0.03	BOLIP1	1.65
0.09	BOLIP2	11.26
0.21	BOLIP3	10.51
0.30	BOLIP4	10.21
0.43	BOLIP5	2.76
0.48	BOLIP6	2.03
0.55	BOLIP7	17.13
0.61	BOLIP8	29.03
0.71	BOLIP9	2.74
0.80	BOLIP10	7.39
0.89	BOLIP11	5.29

**Tab. 3 Relative Mengen der Lipide von *B. burgdorferi***

### 3.10. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die Glyko- und Phospholipidbanden von *B. burgdorferi* sich noch weiter auftrennen lassen. Bei Glyko- oder Phospholipide kann eine weitere Auftrennung der Banden durch eine zweite Chromatographie erreicht werden (s. 2.5.4.2.).

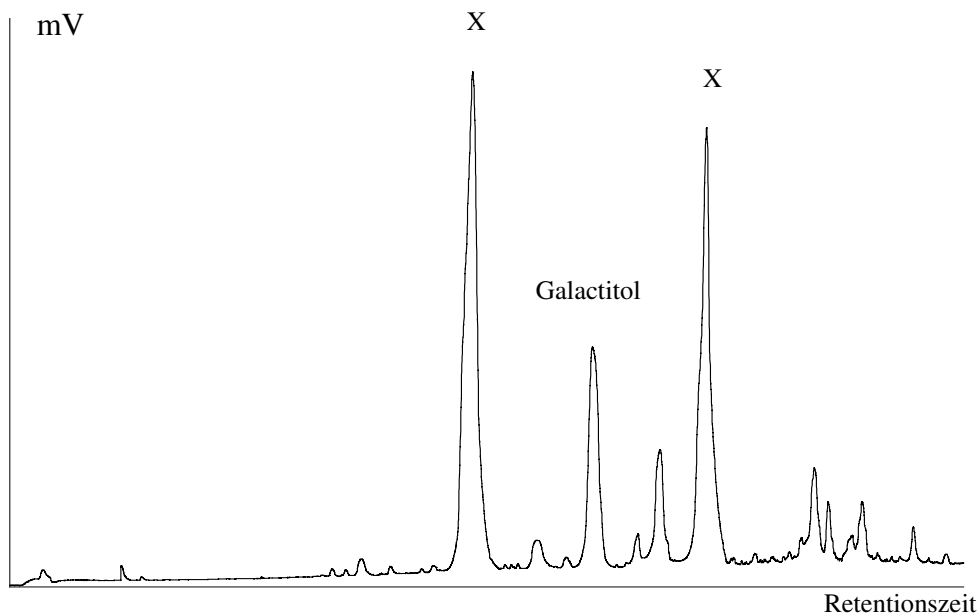
Sowohl die Glykolipide Bolip 7 und 8 als auch die Phospholipide Bolip 2 und 3 zeigten keine weitere Auftrennung in der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie, daher ist es anzunehmen, daß es sich bei diesen Lipiden um homogene Fraktionen handelt.

### 3.11. Strukturanalyse der Glykolipide

#### 3.11.1. Kohlenhydratbausteinanalyse der Gesamtlipide von *B. burgdorferi*

Die Analyse der Kohlenhydratstrukturen im Gesamtlipid von *B. burgdorferi* erfolgt analog zu den Methlierungsanalysen (s. 2.6.2.). Die erhaltenen Alditol-Acetate werden durch Gaschromatographie analysiert. Für die Detektion der Kohlenhydrate wird ein Flammenionisationsdetektor eingesetzt. Die Identifizierung der Kohlenhydrate erfolgt anhand der Retentionszeiten der Alditol-Acetate [73].

Die Bausteinanalyse des Gesamtlipides von *B. burgdorferi* zeigte nur die Präsenz von Galaktose als einzigen Kohlenhydratbaustein in den Lipiden von *B. burgdorferi*, andere Kohlenhydrate konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 23).



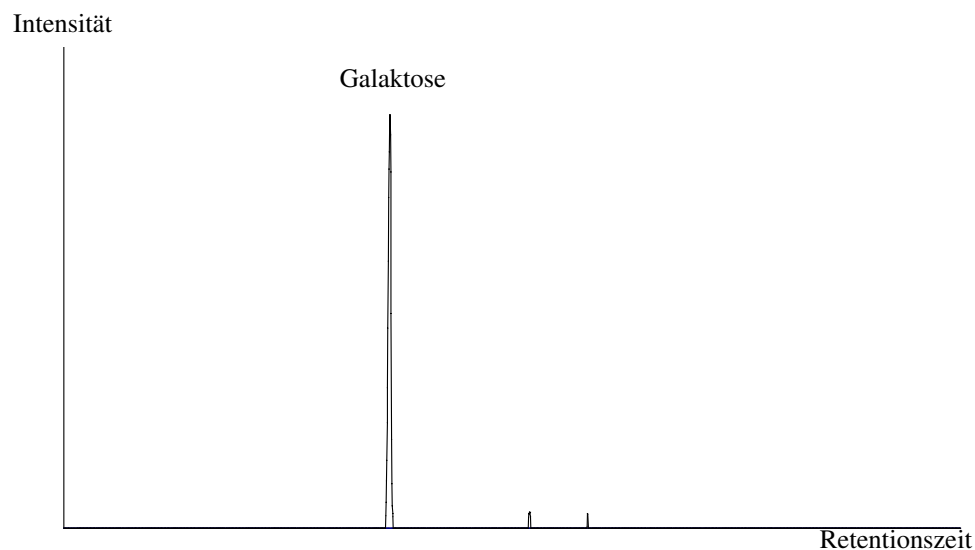
**Abb. 23 Bausteinanalyse des Gesamtlipides von *B. burgdorferi***

Die nach Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung erhaltenen Alditol-Acetate wurden durch GC analysiert. Die Trennung erfolgte an einer Quarz-Kapillarsäule mit chemisch gebundener Phase. Zur Detektion wurde ein Flammenionisationsdetektor verwendet. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten der Alditol-Acetate

X: Verunreinigung

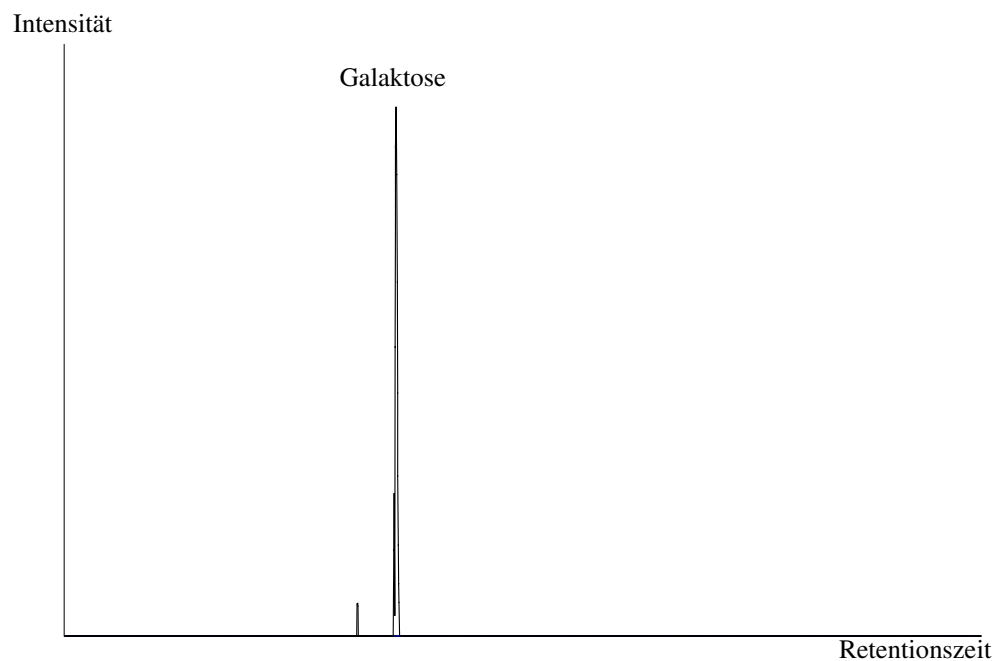
### 3.11.2. Methylierungsanalyse

Um Informationen über die Substitution der einzelnen Zuckerkomponenten eines Oligosaccharids zu erhalten, wurden Methylierungsanalysen durchgeführt (s. 2.6.2.). Die Methylierungsanalyse der Glykolipide von *B. burgdorferi*, Bolip 7 und 8, ergab in beiden Glykolipiden nur eine terminal gebundene Galaktose (Abb. 24 und 25).



**Abb. 24 Methylierungsanalyse der Lipidfraktion Bolip7**

Die nach Methylierung, Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung erhaltenen partiell methylierten Alditol-Acetate wurden durch kombinierte GC/MS analysiert. Die Detektion erfolgte nach chemischer Ionisation mit Ammoniak. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten und Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  und  $[M+NH_4]^+$  der Alditol-Acetate.



**Abb. 25 Methylierungsanalyse der Lipidfraktion Bolip 8**

Die nach Methylierung, Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung erhaltenen partiell methylierten Alditol-Acetate wurden durch kombinierte GC/MS analysiert. Die Detektion erfolgte nach chemischer Ionisation mit Ammoniak. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten und Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  und  $[M+NH_4]^+$  der Alditol-Acetate.

### 3.11.3. Bestimmung der anomeren Konfiguration des Kohlenhydratanteiles der Glykolipide

Um festzustellen, ob es sich bei der Galaktose der beiden Glykolipide, Bolip 7 und 8, um  $\alpha$ - oder  $\beta$ -gebundene Galaktose handelt, wurde eine Chromtrioxid-Oxidation durchgeführt (s. 2.6.5.ff). Dabei konnte festgestellt werden, daß die Galaktose in beiden Glykolipiden nur unwesentlich oxidiert bzw. zerstört wurde, was auf eine  $\alpha$ -gebundene Galaktose deutete (Tab. 4).

	Ohne Chromtrioxid-Oxidation	Nach Chromtrioxid-Oxidation
Gal-Bolip 7	1.0	0.9
Gal-Bolip 8	1.0	0.9

#### Tab. 4 Chromtrioxid-Oxidation der Lipidfraktionen Bolip 7 und 8

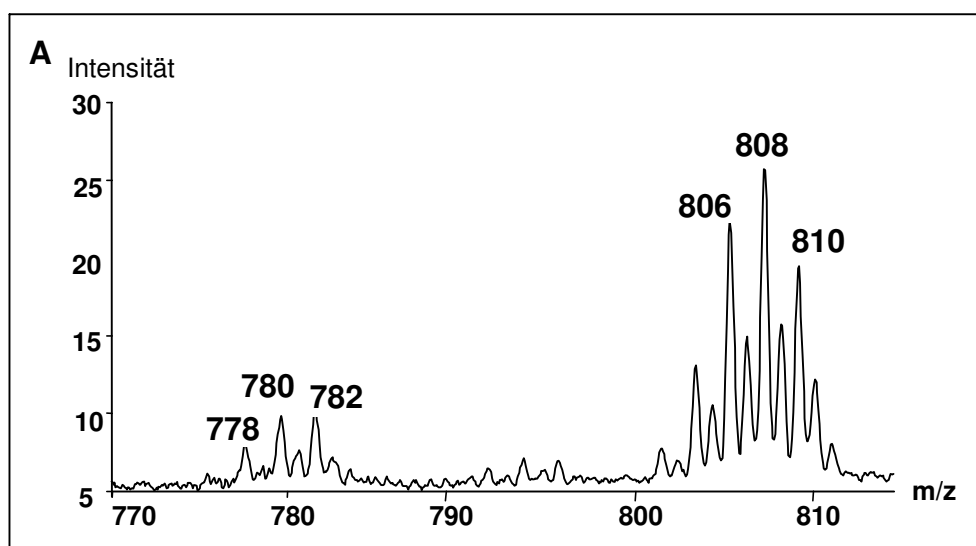
Um die anomere Konfiguration des Kohlenhydratanteils des Glykolipids zu bestimmen ( $\alpha$  oder  $\beta$  gebunden), werden die Glykolipide zunächst peracetyliert (s. 2.6.5.1.) und anschließend mit Chromtrioxid oxidiert. Bei der anschließenden Bausteinanalyse kann anhand der GC/MS eine Veränderung des Kohlenhydrates nachgewiesen werden. Galaktose ohne Chromtrioxid-Oxidation wurde gleich 1,0 gesetzt.

### 3.11.4. Massenspektrometrie (MALDI-TOF) der Lipide von *B. burgdorferi*

Mit der „Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight“ (MALDI-TOF) Massenspektrometrie kann man Lipide in geringsten Mengen untersuchen. Anhand der Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  können Rückschlüsse über die Molekülzusammensetzung gezogen werden.

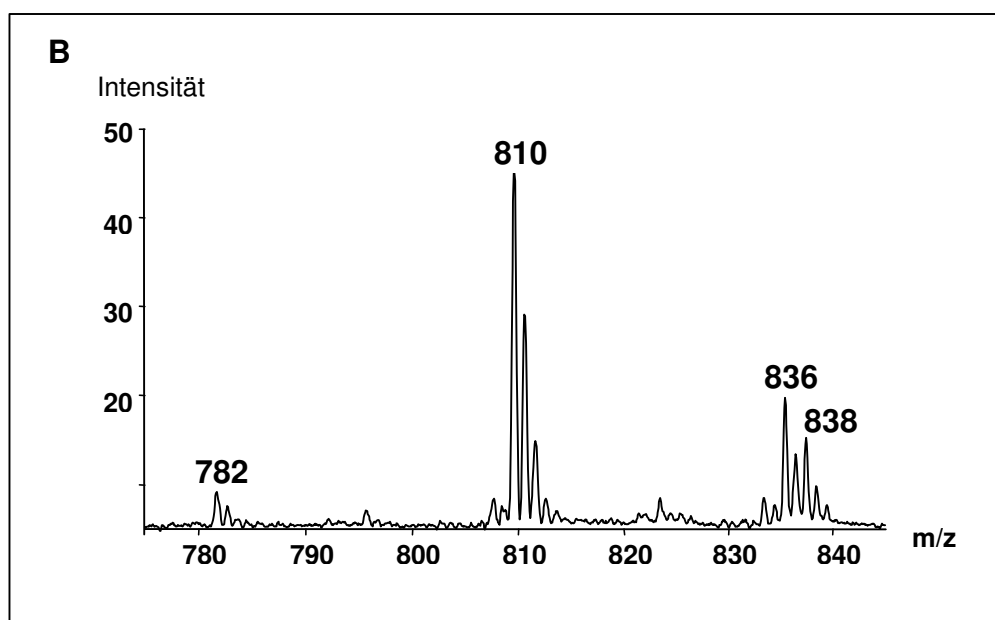
Die Pseudomolekülonen der Borrelienlipide Bolip 1 bis 11 sind im Anhang angegeben. Wichtig für diese Studie waren die Pseudomolekülonen der beiden Glykolipide, Bolip 7 und 8, weil diese die einzigen immunogenen Fraktionen waren, und die der beiden Phospholipide, Bolip 2 und 3. Auf diese vier Hauptfraktionen der Lipide von *B. burgdorferi* richtete sich das weitere analytische Augenmerk. Die MALDI-TOF-Analyse im positiven Reflektron-Mode ergab für Bolip 7 die Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  bei  $m/z$  778, 780, 782, 804, 806, 808 und 810, während die Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  für Bolip 8 bei  $m/z$  782, 810, 836 und 838 lagen (Tab. 6, Abb. 26A und B).





**Abb. 26A Massenspektrometrische Daten des Glycolipids Bolip 7**

Glycolipide wurden mittels MALDI-TOF-MS mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix im Positiv-Ionen-Mode analysiert. Die Massenangaben entsprechen Pseudomolekülionen  $[M+Na]^+$  und sind gerundet.



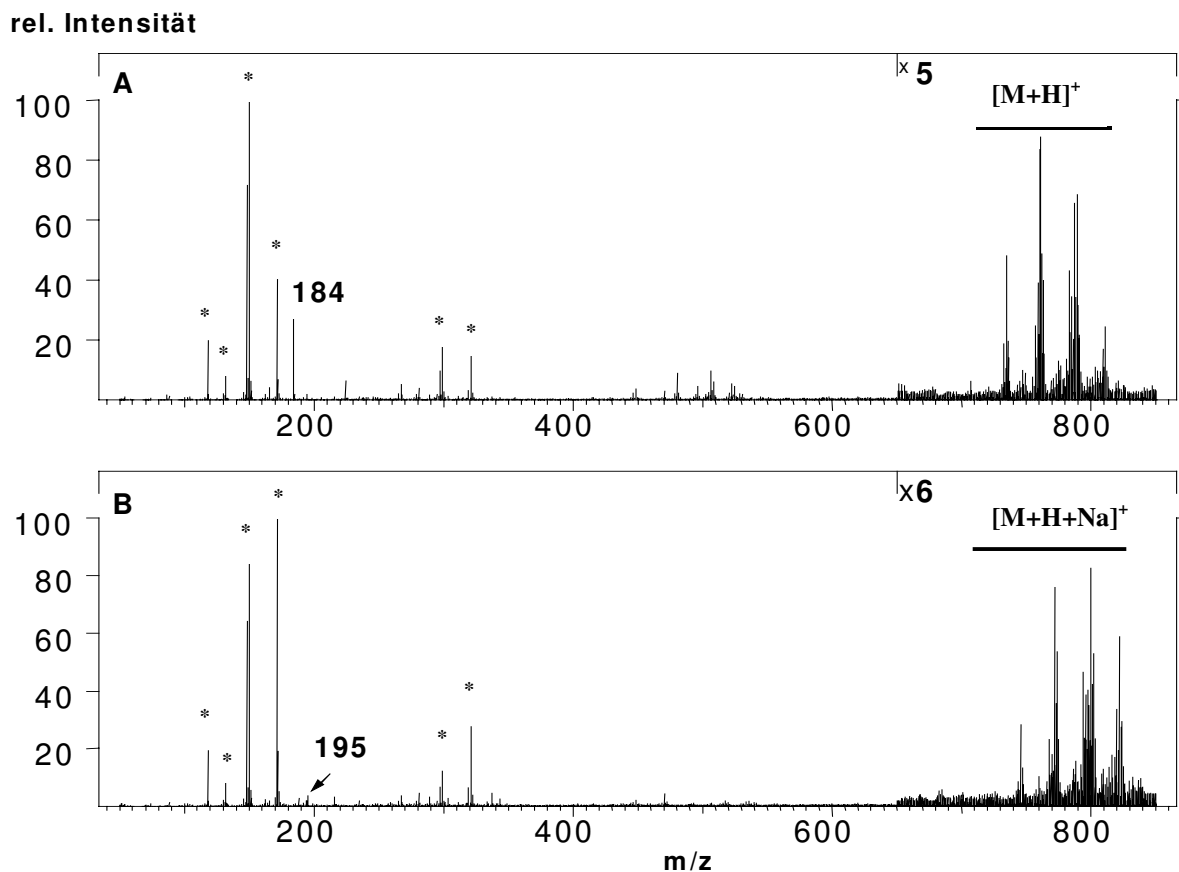
**Abb. 26B Massenspektrometrische Daten des Glycolipids Bolip 8**

Glycolipide wurden mittels MALDI-TOF-MS mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix im Positiv-Ionen-Mode analysiert. Die Massenangaben entsprechen Pseudomolekülionen  $[M+Na]^+$  und sind gerundet.

### 3.11.5. Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (LSIMS) der Phospholipide

Mit der Liquid-Secondary-Ion-Mass-Spectrometry (LSIMS) wurden die beiden Phospholipide, Bolip 2 und 3, von *B. burgdorferi* im Positiv-Ionen-Mode untersucht. LSIMS von Bolip 2 ergaben Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  757, 759, 761, 783, 785, 787 und 789. Ein Fragment-Ion bei  $m/z$  184 wies eindeutig auf das Vorhandensein eines Phosphocholin-Restes hin. Die LSIMS zeigte, daß es sich bei dem Phospholipid Bolip 2 um Phosphatidylcholin (Lecithin) handelt.

Das Phospholipid Bolip 3 wurde durch die Pseudomolekülonen  $[M+H+Na]^+$  bei  $m/z$  768, 770, 772, 794, 796, 798 und 800 charakterisiert. Ein Fragment-Ion bei  $m/z$  195 deutete auf die Präsenz eines Phosphoglycerol-Restes hin. Die LSIMS ergab somit, daß es sich bei Bolip 3 um Phosphatidylglycerol handelt (Abb. 27A und B, Tab. 6).



**Abb. 27A und B** Massenspektrometrische Daten der Phospholipide von *B. burgdorferi*

Phospholipide wurden mittels LSIMS mit Triethanolamin als Matrix im Positiv-Ionen-Mode analysiert. Die Massen entsprechen Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  und  $[M+H+Na]^+$  und sind gerundet.

A = Phosphatidylcholin (Bolip 2)

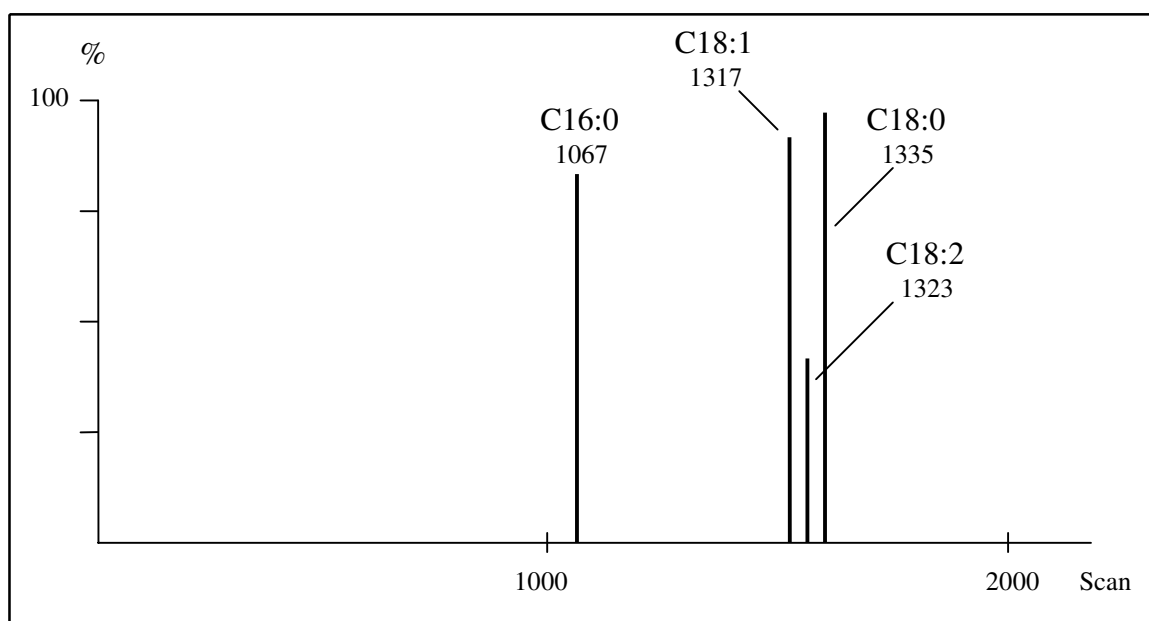
B = Phosphatidylglycerol (Bolip 3)

### 3.11.6. Fettsäure-Analyse der Lipide von *B. burgdorferi*

Für die Analyse der Fettsäuren der Glyko- und Phospholipide von *B. burgdorferi* wurden diese zunächst hydrolysiert (s. 2.6.7.1.) und in die entsprechenden Methylester überführt. Nach Extraktion mit n-Hexan erfolgte die Identifizierung der Fettsäuremethylester durch kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie nach Ionisation mit Ammoniak.

Hierbei konnten alle Fettsäuren anhand ihrer Pseudomolekülonen  $[M+NH_4]^+$  eindeutig identifiziert werden. Die Fettsäureanalyse zeigte, daß die Fettsäuren der Glyko- und Phospholipiden sich aus geradkettigen Fettsäuren zusammen setzten, wobei vornehmlich Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0), Ölsäure (C18:1), Linolsäure (C18:2), Linolensäure (C18:3) und Arachidonsäure (C20:0) nachgewiesen wurden..

Die Ergebnisse sind in Tab. 5 und Abb. 28 zusammengefaßt.



**Abb. 28 Gaschromatographisch/Massenspektrometrische Analyse der Fettsäuremethylester der Gesamtlipide von *B. burgdorferi* nach chemischer Ionisation mit Ammoniak**

Die Trennung der durch saure Hydrolyse freigesetzten Fettsäuremethylester des Gesamtlipids von *B. burgdorferi* erfolgte an einer Quarz-Kapillarsäule mit chemisch gebundener Phase (DB-1701, 0.25 mm, 60 m; ICT). Die Detektion wurde massenspektrometrisch nach chemischer Ionisation mit Ammoniak durchgeführt. Die Identifizierung der Fettsäuremethylester erfolgte anhand des Vergleichs der Retentionszeiten und Pseudomolekülonen  $[M+NH_4]^+$  mit denen von bekannten Fettsäuremethylester-Standards.

Fettsäuremethylester	Relative Mengen				
	Gesamtlipid	Phosphatidyl- cholin (Bolip 2)	Phosphatidyl- glycerol (Bolip 3)	Glykolipid (Bolip 7)	Glykolipid (Bolip 8)
C16:0 (Palmitinsäure)	27.2	35.5	24.3	16.2	53.0
C18:0 (Stearinsäure)	31.0	32.9	48.8	36.5	16.7
C18:1 (Ölsäure)	30.6	25.7	22.0	35.3	25.3
C18:2 Linolsäure)	11.2	5.9	4.9	12.0	5.0
C18:3 (Linolensäure)	Spuren				
C20:0 (Arachidon- säure)	Spuren				

**Tab. 5 Prozentuale Verteilung der Fettsäuren am Gesamtlipid und an den Glyko- und Phospholipiden von *B. burgdorferi***

Das Lipidextrakt wurde hydrolysiert, die Fettsäuremethylester extrahiert und gas-chromatographisch aufgetrennt. Die Identifizierung erfolgte anhand ihrer Retentionszeiten und Pseudomolekülonen.

Lipidfraktion	Chemische Struktur	Pseudomolekülionen	Fettsäuren
Bolip-2	Phosphatidylcholin	757 *	16:0; 18:2
		759 *	16:0; 18:1
		761 *	16:0; 18:0
		783 *	18:0; 18:3
		785 *	18:0; 18:2
		787 *	18:0; 18:1
		789 *	18:0; 18:0
Bolip-3	Phosphatidylglycerol	768 *\$	16:0; 18:2
		770 *\$	16:0; 18:1
		772 *\$	16:0; 18:0
		794 *\$	18:0; 18:3
		796 *\$	18:0; 18:2
		798 *\$	18:0; 18:1
		800 *\$	18:0; 18:0
Bolip-7	Galactoglycerolipid	778 ¶	16:0; 18:2
		780 ¶	16:0; 18:1
		782 ¶	16:0; 18:0
		804 ¶	18:0; 18:3
		806 ¶	18:0; 18:2
		808 ¶	18:0; 18:1
		810 ¶	18:0; 18:0
Bolip-8	Galactoglycerolipid	782 ¶	16:0; 18:0
		810 ¶	18:0; 18:0
		836 ¶	20:0; 18:1
		838 ¶	20:0; 18:1

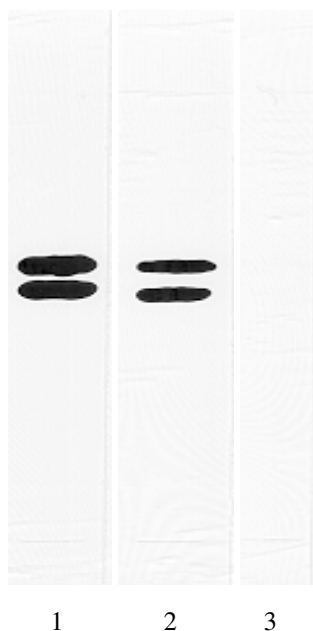
**Tab. 6 Zusammenfassung der massenspektrometrischen Daten der Glyco- und Phospholipide von *B. burgdorferi***

Die Lipide wurden nativ für MALDI-TOF-MS bzw. nativ, permethyliert und peracetyliert für LSIMS Messungen eingesetzt. Es wurden in der Regel Pseudomolekülionen  $[M+H]^+$  bzw.  $[M+Na]^+$  registriert und die exakten m/z-Werte gerundet

\*  $[M+H]^+$ ; \$ nach Natriumacetat-Zugabe; ¶  $[M+Na]^+$ .

### 3.12. Darstellung der Immunogenität des Galaktose-Restes an den Glykolipiden Bolip 7 und 8 mittels Perjodat-Oxidation

Die Galaktolipide sind die einzigen immunogenen Lipidfraktionen von *B. burgdorferi*, die Antikörper von Lyme-Borreliose-Patienten binden können. Um die Spezifität der Galaktose als Bindungsort der Antikörper darzustellen, wurde der Galaktoserest der beiden Glykolipide mittels Perjodat oxidiert und somit zerstört. In der nachfolgenden immunologischen Färbung mit Serum von Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium II war eine Anfärbung der beiden Glykolipide nicht mehr sichtbar. Demnach konnten durch die Zerstörung der Galaktose Antikörper nicht mehr spezifisch binden und somit auch nicht dargestellt werden. Dieses Ergebnis spricht für die Spezifität der Galaktose als Bindungsort der Antikörper gegen die Glykolipide (Abb. 29).



**Abb. 29 Darstellung der Bedeutung der terminal-gebundenen Galaktose als spezifischer Bindungsort für Antilipid-Antikörper bei Lyme-Borreliose**

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) chromatographisch aufgetrennt. Die chemische Detektion der Glycolipide erfolgte mit Orcinol/ $H_2SO_4$  (1).

Der Immunoblot wurde mit Serum vom Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium II durchgeführt (Serumverdünnung 1:100).

1 = Orcinolfärbung  
Perjodatbehandlung

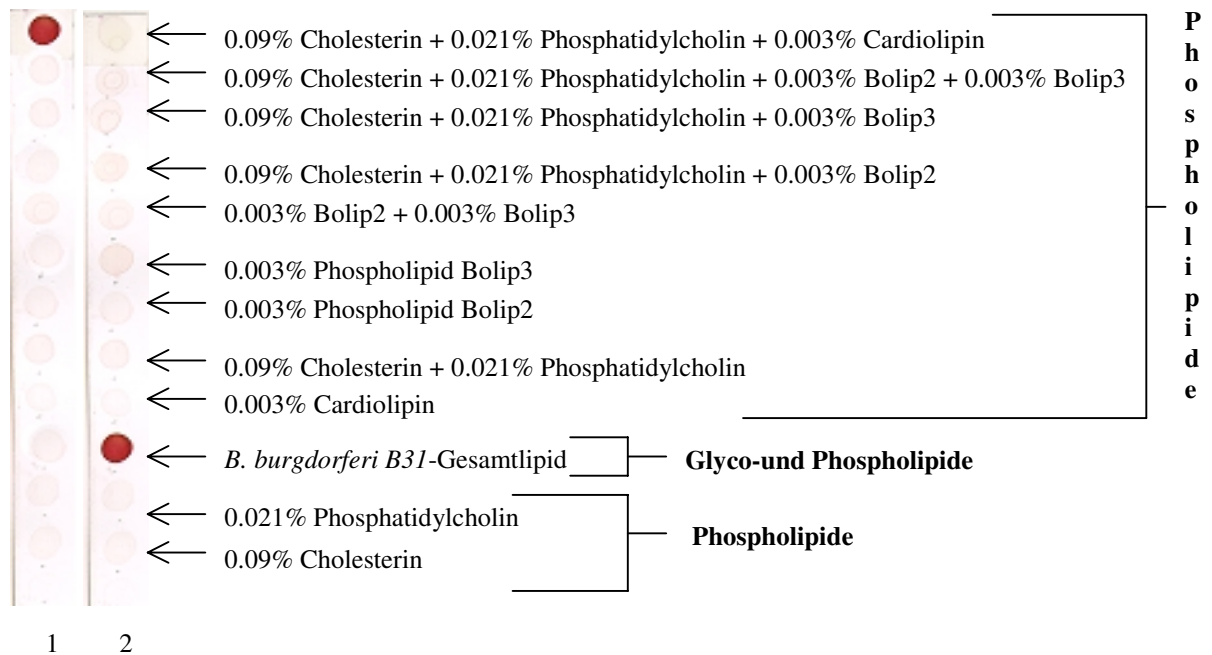
2 = Immunoblot vor Perjodatbehandlung

3 = Immunoblot nach

### 3.13. Darstellung der Antigenität der Phospholipide von *B. burgdorferi* durch Komplexierung mit Phosphatidylcholin und Cholesterin

In der Diagnostik der Syphilis wird der „Veneral Disease Research Laboratory“-Test (VDRL) regelmäßig als Verlaufskontrolle nach antibiotischer Therapie [209-213] eingesetzt. Als Antigen dient dabei Cardiolipin, welches eine schwache eigene Antigenität besitzt. Wird das Cardiolipin allerdings mit Cholesterin und Phosphatidylcholin komplexiert, tritt eine deutliche Verstärkung der Antigenität auf. Als Ursache für die stärkere Antigenität wird eine verbesserte Antigenpräsentation durch die Komplexierung angenommen. Da die Phospholipide von *B. burgdorferi* bisher keine Antigenität in den immunologischen Untersuchungen gezeigt haben, soll analog zum VDRL-Test geprüft werden, ob die Komplexierung der Borrelien-Phospholipide mit Cholesterin und Phosphatidylcholin eine Verstärkung der Antigenität zeigt. Cholesterin, Phosphatidylcholin, das Borreliengesamtlipid, die Borrelien-Phospholipide und das Cardiolipin wurden sowohl einzeln als auch im Komplex mit Cholesterin/ Phosphatidylcholin auf einen Immobilonstreifen pipettiert und mit Serum von einem Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium II und einem Syphilis Patienten immunologisch dargestellt. Bei dem Syphilisserum wurde ein Serum mit positivem VDRL-Titer eingesetzt.

Die Dot-Blot-Analyse ergab mit dem Borrelioseserum lediglich eine Darstellung des Borreliengesamtlipids. Cholesterin, Phosphatidylcholin, die Borrelien-Phospholipide und das Cardiolipin zeigten weder einzeln noch im Komplex mit Cholesterin/ Phosphatidylcholin eine Reaktion mit dem Borrelioseserum. Demnach läßt sich die Antigenität der Phospholipide von *B. burgdorferi* auch durch Komplexierung und damit besserer Antigenpräsentation nicht verstärken. Das Syphilisserum mit hohem VDRL-Titer reagierte nur mit dem komplexierten Cardiolipin; das Borreliengesamtlipid, die nativen und komplexierten Borrelienphospholipide, Cholesterin, Phosphatidylcholin und das native Cardiolipin zeigten keinerlei Reaktion mit dem Syphilisserum. Dieses Ergebnis zeigt, daß eine Kreuzreaktivität zwischen dem Treponemenphospholipid Cardiolipin und den Borrelienphospholipiden nicht anzunehmen ist (Abb. 30, Tab. 8).



### Abb. 30 Dotblotanalyse der nativen und komplexierten Lipide von *B. burgdorferi*

Je 1 µl der nativen bzw. komplexierten Lipide wurde auf einem Immobilon-Papier aufgetragen. Anschließend erfolgte ein Immunoassay mit je einem Borreliose- und Syphilisserum (Verdünnung 1:100). Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit einem peroxidase-markierten Zweitantikörper nachgewiesen (1:1000).

1 = Syphilisserum

2 = Borrelioseserum



<b>Native bzw. komplexierte Lipide</b>	<b>Syphilis-Serum</b>	<b>Borreliose-Serum</b>
0.09% Cholesterin	-	-
0.021% Phosphatidylcholin	-	-
B. burgdorferi B31-Gesamtlipid	-	+
0.003% Cardiolipin	-	-
0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin	-	-
0.003% Phospholipid Bolip2	-	-
0.003% Phospholipid Bolip3	-	-
0.003% Bolip2 + 0.003% Bolip3	-	-
0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip2	-	-
0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip3	-	-
0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip2 + 0.003% Bolip3	-	-
0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Cardiolipin	+	-

**Tab. 7 Darstellung der Ergebnisse der Dotblotanalyse**

- = keine Reaktion

+ = Positive Reaktion

## 4. Diskussion

In den beiden letzten Jahrzehnten lernte man die Lyme-Borreliose als eine neue komplexe Infektionskrankheit kennen. Sie ist die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in den gemäßigten Klimazonen [167, 214] (Abb. 31).



**Abb. 31 Verbreitung der Lyme-Borreliose**

Hervorgerufen wird die Erkrankung durch die Spirochäte *B. burgdorferi*, die von infizierten Zecken im Rahmen einer Blutmahlzeit auf den Menschen oder auf Tiere übertragen wird.

Die Lyme-Borreliose mit ihrer vielfältigen Symptomatik gewinnt zunehmend an Bedeutung. Die steigende Zahl der klinischen Manifestationen macht die Entwicklung verbesserter spezifischer Diagnostika und effektiver Vakzine dringend erforderlich.

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte bei der Aufklärung der molekularen Struktur sowie der Heterogenität und Antigenvariabilität von *B. burgdorferi* erzielt [215]. Dabei stand vor allem die Analyse der Oberflächenproteine („Outer Surface Protein“, Osp) im Mittelpunkt der Forschung [5, 16-19]. Viele dieser Oberflächenproteine sind Lipoproteine und an Wechselwirkungen mit der körpereigenen Abwehr und der Pathogenese der Lyme-Borreliose beteiligt [24, 186-200]. Es zeigten sich aber auch große Unterschiede in Verteilung und spezifischer Immunität dieser Lipoproteine, und das nicht nur zwischen amerikanischen und europäischen Stämmen von *B. burgdorferi*, sondern auch innerhalb einer Borrelienpopulation [19, 31-34]. Diese Heterogenität und Antigenvariabilität bedingt auch die schwierige Standardisierung von serologischen Tests und die Etablierung einer weltweit einsetzbaren Vakzine.

Es sind immer noch viele Faktoren des Erregers und des Wirts unbekannt, welche zur Pathogenese bzw. zur Protektion beitragen. Insbesondere weiß man noch wenig über Aspekte der Erregerausbreitung, der differentiellen Infektion verschiedener Organe und der Persistenz

der Erreger. Auch die Rolle natürlicher Resistenzmechanismen und immunologisch spezifischer Abwehrmechanismen ist noch weitgehend unklar [215].

Aber nicht nur Proteine spielen eine Rolle bei der Pathogenese der Lyme-Borreliose, sondern auch die Lipide von *B. burgdorferi* sind daran beteiligt. Die Existenz immunreaktiver Lipide von *B. burgdorferi* ist beschrieben [39, 40, 44, 45, 46], aber nur wenig ist über die Struktur und Funktion dieser Lipide bekannt.

In der serologischen Abteilung unseres diagnostischen Routinelabors konnten wir regelmäßig auf den Immunoblots von Lyme-Borreliose Patienten eine antigene Bande an der Lauffront des Bromthymolblau feststellen. Diese schnelllaufende Bande bei < 10 kDa reagierte stark mit Seren von Lyme-Borreliose Patienten, ließ sich aber nicht mit Proteinfarbstoffen darstellen, zeigte aber gleichzeitig eine Löslichkeit in Chloroform. Diese Eigenschaften deuteten auf die Existenz eines nicht-proteinösen Agens. In dieser Studie wird die Analyse der Struktur und des immunologischen Verhaltens der Lipide von *B. burgdorferi* beschrieben.

Spirochäten zählen zu den lipidreichen Bakterienfamilien [49-59]. Für einige Spezies der Gattungen *Treponema* und *Spirochaeta* sind 14 bis 30% Gesamtlipid beschrieben [49], während bei Leptospiren der Lipidgehalt nur 8 bis 10% des Trockengewichtes beträgt [59]. Wir konnten zeigen, daß auch *B. burgdorferi* zu den lipidreichen Gattungen gehört.

Der Lipidanteil betrug 25 – 30% des Gesamttrockengewichts und war damit vergleichbar hoch mit dem Lipidanteil von *Treponema* und *Spirochaeta*.

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* konnte dünnenschichtchromatographisch in 11 verschiedene Fraktionen aufgetrennt werden. Dies ist die erste Beschreibung einer derart hohen Anzahl an auftrennbaren Lipidfraktionen beim Gesamtlipid von *B. burgdorferi* B31. Bisher wurden lediglich 4 Lipidfraktionen bei *B. burgdorferi* B31 durch die Arbeitsgruppe um Wheeler beschrieben [45]. Dieser Unterschied in der Anzahl der Fraktionen ist zum Einen auf unsere verbesserte Lipidextraktion und –aufreinigung und zum Anderen auf die Verwendung optimaler Laufmittel zurückzuführen.

Mittels chemischer Färbungen der Fraktionen konnten zwei Glykolipide und zwei Phospholipide nachgewiesen werden. Die Glykolipide hatten mit 50% den größten Anteil am Gesamtlipid, gefolgt von den Phospholipiden mit jeweils 10%. Insgesamt machten diese vier Hauptfraktionen etwa 70% der Gesamtlipide aus.

Ähnlich hohe Mengen an Glykolipid (ca. 50%) fanden Livermore et al. [49] bei *Spirochaeta* und *Treponema*, wogegen die Menge an Phospholipid (50%) bei beiden Gattungen deutlich höher war als die von *B. burgdorferi* (20%). Ausnahmen bildeten *Spirochaeta aurantia* mit 85% Glykolipidgehalt und *Treponema denticola* mit 80% Phospholipidgehalt [49].

Bei den beiden Borrelien-Glykolipiden handelte es sich jeweils um Monoglykosyldiglyceride. Mittels massenspektrometrischer und gaschromatographischer Methoden konnten sie als  $\alpha$ -Galaktosyldiacylglycerol mit jeweils unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung identifiziert werden. Die unterschiedliche Fettsäurekomposition erklärt auch die unterschiedlichen Laufweiten in der Dünnschichtchromatographie.

Monogalaktosyl-Diacylglycerole wurden bereits in den Gattungen *Treponema* und *Spirochaeta* nachgewiesen, aber nicht in *Treponema pallidum* [218] und nicht in *Leptospira* [49]. Auch in *Borrelia hermsii*, dem Erreger des Rückfallfiebers konnte Monogalaktosyl-Diacylglycerol nachgewiesen werden [54].

Die beiden Phospholipide von *B. burgdorferi* konnten als Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglycerol (PG) identifiziert wurden, während Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und Cardiolipin (CL) nicht nachgewiesen wurden. Es ist beschrieben, daß PC zusammen mit CL die Hauptfraktion der Phospholipide bei *Treponema* bildet, während PE das häufigste Phospholipid bei *Leptospira* ist [49]. In *Spirochaeta* dagegen konnte nur PG nachgewiesen werden [49]. Bei *B. hermsii* wurden sowohl PC als auch PG nachgewiesen [54], während bei *T. pallidum* insgesamt 6 Phospholipide (PC, PG, PE, PS, PI und CL) identifiziert wurden [142].

Es besteht somit die Möglichkeit die Gattungen *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira* und *Spirochaeta* anhand ihrer Glyko- und Phospholipidzusammensetzung voneinander zu unterscheiden (Tab.9)

Organismus	Kohlenhydrat- und Phospholipidbestandteil <sup>a</sup>						
	Glukose	Galaktose	PC	PG	PE	PS	CL
<i>B. burgdorferi</i>	–	+++	++	++	–	–	–
<i>T. pallidum</i>	NI	–	++	++	+	+	++
<i>T. phagedenis</i>	–	+++	++	+	++	–	+
<i>T. denticola</i>	+	++	+++	+	++	–	+
<i>S. aurantia</i>	+++	–	–	+++	–	–	++
<i>S. zuelzeri</i>	+++	–	–	++	–	–	++
<i>L. interrogans</i>	NI	–	–	+	+	–	+

**Tab. 9 Verteilung der Glyko- und Phospholipide bei Spirochäten**

<sup>a</sup> +++ hauptsächlich vorhanden; ++ signifikant vorhanden; + wenig vorhanden; – nicht vorhanden.

Die Fettsäureanalyse der Lipide von *B. burgdorferi* ergab zu je etwa 30% die gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (C16:0) und Stearinsäure (C18:0), während die ungesättigten Fettsäuren mit 30.6% Ölsäure (C18:1) und 11.2% Linolsäure (C18:2) vertreten waren. Im Gegensatz dazu dominierte bei der Gattung *Treponema* Palmitinsäure mit ca. 50%, gefolgt von Ölsäure (ca. 50%), während Linolsäure und Stearinsäure lediglich als Spuren vorlagen [49]. Auch bei *T. pallidum* bildete Palmitinsäure (52.5%) die Hauptfraktion der Fettsäuren, während Stearinsäure (21.4%), Ölsäure (15.3%) und Linolsäure (8.9%) deutlich weniger vorhanden waren als bei *B. burgdorferi* [142]. Bei den *Spirochaeta* dagegen waren 3-20% Palmitinsäure und 1-12% Ölsäure beschrieben, während Stearin- und Linolsäure nur als Spuren vorlagen [49]. Die Fettsäurekomposition von *L. interrogans* war ähnlich wie bei *B. burgdorferi* mit etwa je 27% Palmitinsäure und Ölsäure verteilt, während Linolsäure mit 27.4% deutlich vermehrt und Stearinsäure mit nur 1.7% deutlich vermindert vorhanden war [59].

Abhängig vom Fettsäuremuster des Mediums bietet die Fettsäureanalyse eine gute Möglichkeit die verschiedenen Gattungen von Spirochäten voneinander zu unterscheiden (Tab. 10).

Organismus	Fettsäure <sup>a</sup>			
	16:0	18:0	18:1	18:2
<i>B. burgdorferi</i>	27.2	31	30.6	11.2
<i>T. pallidum</i>	52.5	21.4	15.3	8.9
<i>T. phagedenis</i>	51.3	Spuren	48.7	Spuren
<i>T. denticola</i>	53.4	Spuren	29.6	Spuren
<i>S. aurantia</i>	19.7	Spuren	11.9	Spuren
<i>S. zuelzeriae</i>	3.5	Spuren	1.6	Spuren
<i>L. interrogans</i>	26.9	1.7	26.5	27.4

**Tab. 10 Relative prozentuale Verteilung der Fettsäuren bei Spirochäten**

<sup>a</sup> Die Zahl vor dem Doppelpunkt gibt die Länge der Fettsäure an, die Zahl nach dem Doppelpunkt die Anzahl der Doppelbindungen.

Zur Unterscheidung der Spirochäten kann man aber auch den Lipidmetabolismus der einzelnen Gattungen hinzuziehen und miteinander vergleichen.

Früherer Studien haben gezeigt, daß *Spirochaeta* in der Lage sind ihre Lipide de novo zu synthetisieren [49], während *Borrelia*, *Treponema* und *Leptospira* dies nicht vermögen [49, 54, 142].

Die drei letztgenannten Gattungen sind daher auf exogene Fettsäuren im Medium angewiesen. Die komplette Sequenzierung des *B. burgdorferi* Genoms zeigte das Fehlen von Genen für die Synthese von Fettsäuren, so daß die Fettsäure-Komposition von *in vitro* kultivierten *B. burgdorferi* die Fettsäure-Verteilung des Wachstumsmediums widerspiegelt [54, 55, 80]. Ähnlich wie *Treponema* und *Spirochaeta* ist *B. burgdorferi* nicht in der Lage eine Beta-Oxidation von langen Fettsäure-Ketten durchzuführen, um diese als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Von den Spirochäten vermag nur die Gattung *Leptospira* die Beta-Oxidation von Fettsäure-Ketten als Energiequelle zu nutzen [53, 55, 59].

Die Kenntnis des Lipidmetabolismus und der Lipidkomposition der verschiedenen Spirochätengattungen ermöglicht nun die Identifizierung und Zuordnung neuer Isolate.

Tabelle 11 demonstriert wie Lipidkomposition und Metabolismus als taxonomische Marker benutzt werden können, um besser neue Isolate differenzieren und charakterisieren zu können. Da auf der einen Seite die Spirochäten sehr lipidreich sind und auf der anderen Seite die Nachweismethoden (HPTLC, MALDI, LSIMS, GC-MS) sehr sensitiv sind, braucht man nur kleinste Mengen an Probe, um relativ schnell (1-2 Tage) ein neues Isolat identifizieren zu können. Es genügt bereits, eine kleine Probe auf einer HPTLC-Platte dünnschichtchromatographisch aufzutrennen und mittels Spray-Reagenzien auf Glykolipid und Phosphatidylethanolamin zu untersuchen. Mit dem Ergebnis läßt sich bereits eine Zuordnung zu einer der Spirochätengattungen treffen.

Lipidkomposition und Metabolismus <sup>a</sup>	Gattung			
	Borrelia	Treponema	Spirochaeta	Leptospira
De novo Fettsäuresynthese	–	–	+	–
Beta-Oxidation von Fettsäuren	–	–	–	+
Monoglycosyldiacylglycerol	+	+	+	–
Phosphatidylcholin	+	+	–	–
Phosphatidylglycerol	+	+	+	+
Phosphatidylethanolamin	–	+	–	+
Phosphatidylserin	–	+*	–	–
Cardiolipin	–	+	+	+

**Tab. 11 Differenzierung der Spirochäten anhand der Lipidkomposition**

\* Gilt nur für *T. pallidum*

<sup>a</sup> + vorhanden; – nicht vorhanden.

Lipopolysaccharide (LPS) kommen häufig in der Außenmembran von gram-negativen Bakterien vor. Normalerweise besteht das LPS aus 3 Komponenten: dem O-Antigen, dem Kernsaccharid und dem Lipid A. Das O-Antigen besteht aus sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten, wobei jede Einheit aus 3-5 Hexosen besteht. Diese antigene Region bestimmt die serologische Spezifität des LPS und die Sequenz der Kohlenhydrate ist speziesspezifisch. Das Kernsaccharid ist die Verbindung zwischen O-Antigen und Lipid A und ist chemisch bei vielen Bakteriengruppen ähnlich. Die Verbindung zum Lipid A wird durch das Kohlenhydrat *3-deoxy-D-mannooctulosonic acid*, auch KDO genannt, gewährleistet. Das Lipid A selbst verankert das gesamte Molekül in die Außenmembran des Bakteriums und besteht aus Glukosamin, Phosphat und lang-kettigen Fettsäuren. Da das Lipid A pyrogene Eigenschaften hat, wird das LPS auch als Endotoxin bezeichnet. Lipid A und KDO sind charakteristisch für das LPS und werden als LPS-Marker eingesetzt [219].

Neben den LPS gibt es auch Lipooligosaccharide (LOS). LOS kommen bei sogenannten rauhen Formen (R-Form) von gram-negativen Bakterien vor. R-Formen synthetisieren inkomplette LPS mit mangelhafter bzw. fehlender O-spezifischer Kette oder defektem Kernsaccharid. In der SDS-PAGE zeigen LPS eine langsame Migration mit typischem leiterförmigen Bandenmuster, während LOS eher schnell im Gel laufen und keine Leiterform

bilden [41, 43]. Halter et al. konnten LOS bei *T. hyodysenteriae* nachweisen [38], während Vinh et al. LPS bei *L. interrogans* nachweisen konnten [35-37].

Da es sich bei *B. burgdorferi* auch um ein gram-negatives Bakterium handelt, wurde auch hier die Präsenz eines LPS vermutet. Beck et al. [46] konnten ein LPS mit Lipid A und KDO bei *B. burgdorferi* nachweisen. Diese Ergebnisse konnten von Takayama [39], Eiffert [44] und Cinco [40] nicht bestätigt werden. Diese Autoren fanden weder Lipid A noch KDO und auch sonst keine typischen Merkmale von bakterieller LPS. Sie beschrieben aber alle eine antigene Lipidfraktion, die im SDS-PAGE eine schnelle Migration zeigte, aber sonst keine Attribute von LPS aufwies. Cinco beschrieb diese Fraktion als LOS, aber auch diese Bezeichnung wurde verworfen, da typische Merkmale von LOS nicht nachgewiesen werden konnten. . Mittlerweile hat sich die Bezeichnung und die Existenz einer antigenen *LPS-like* Fraktion etabliert. Auch mittels unserer biochemischen Analysen konnten wir kein LPS bei *B. burgdorferi* nachweisen und somit die Ergebnisse von Takayama bestätigen. Bei der zuvor beschriebenen *LPS-like* Fraktion handelte es sich wahrscheinlich um unsere extrahierte Lipidfraktion von *B. burgdorferi* mit den beiden antigenen Galaktolipiden.

Galaktose war das einzige nachweisbare Monosaccharid im Lipidextrakt von *B. burgdorferi*. Eiffert [44] berichtete über den Nachweis von anderen Kohlenhydraten und Aminoalkoholen wie Glukose, Rhamnose, Mannose, Glukosamin, Galaktosamin oder Ethanolamin im Lipidextrakt von *B. burgdorferi*. Diese Resultate konnten wir nicht bestätigen. Diese Diskrepanz der beiden Analysen könnten bedingt sein durch die unterschiedlichen angewandten Extraktionsverfahren. Die in dieser Studie eingesetzten Extraktions- und Aufreinigungsmethoden führten zu einer hochgereinigten Lipidfraktion, dadurch konnten Fehlanalysen durch proteinöse Bestandteile des Bakteriums oder störende Substanzen aus dem Medium weitgehend eliminiert werden.

Das apparente Molekulargewicht der *LPS-like* Fraktion wurde von Beck [46] und Eiffert [44] bei 4 kDa beschrieben, während Cinco [40] ein Molekulargewicht von etwa 11 kDa feststellte. Mit unseren massenspektrometrischen Untersuchungen konnten wir zeigen, daß das apparente Molekulargewicht zwischen 778 und 838 Da liegt und somit viel kleiner ist als es von den anderen Arbeitsgruppen vermutet wurde. Aufgrund des kleinen Molekulargewichts wandert die Lipidbande in der SDS-PAGE schnell und an der Front von Bromthymolblau. Dadurch kann das Lipid unter chromatographischen Standardbedingungen leicht aus dem Gel wandern und später nicht mehr auf den Immunoblots detektiert werden. Somit ist es nachvollziehbar, daß viele Arbeitsgruppen dieses niedermolekulare Antigen zuvor in ihren Immunoblots nicht bemerkt hatten.



Wir konnten zeigen, daß es sich bei dem Kohlenhydratanteil der beiden Glykolipide um terminale  $\alpha$ -gebundene Galaktose handelte. Um die Wichtigkeit der  $\alpha$ -gebundenen Galaktose für die Antikörperbindung darzustellen, wurde die Galaktose mittels Perjodat-Oxidation zerstört. Immunologische Untersuchungen auf HPTLC-Platten vor der Perjodat-Behandlung zeigten positive Reaktionen der beiden Glykolipide mit Seren von Lyme Borreliose Partienten, während nach der Perjodat-Behandlung eine Immunreaktion der Seren mit den Glykolipiden nicht mehr nachweisbar war. Dieses Ergebnis verdeutlichte die Bedeutung der  $\alpha$ -gebundenen Galaktose als einzige relevante Bindungsstelle für Antikörper gegen Lipide von *B. burgdorferi* B31.

Immunologische Untersuchungen mit Seren von Patienten mit akuter, chronischer oder abgelaufener Lyme Borreliose zeigten starke positive Reaktionen aller Seren nur mit den beiden Glykolipiden, die restlichen 9 Lipidfraktion waren an einer Immunreaktion nicht beteiligt. Dagegen zeigten Seren von Patienten in einem Frühstadium nur schwache Reaktionen mit den Glykolipiden. Seren von syphilitischen Patienten zeigten eine Reaktion weder mit den Glykolipiden noch mit den restlichen 9 Lipidfraktionen. Diese Untersuchungen verdeutlichen, daß Antikörper gegen die Glykolipide in jedem Stadium einer Borreliose vorhanden sind und auch detektiert werden können. Die Antikörper richten sich sehr spezifisch nur gegen die Glykolipide von *B. burgdorferi* und es gibt keinen Anhalt für eine Kreuzreaktivität zwischen den Lipiden von *B. burgdorferi* und *T. pallidum*. Diese Feststellungen sind sehr bedeutsam im Hinblick auf einen Einsatz dieser Glykolipide für die Diagnostik der Lyme Borreliose.

Die Existenz zweier immunreaktiver Lipide von *B. burgdorferi* wurde auch von Wheeler [45] beschrieben und mit F1 und F2 benannt, eine chemische Analyse dieser Lipide wurde allerdings nicht durchgeführt. Im Unterschied zu unseren Daten, zeigten F1 und F2 starke Kreuzreaktivität mit Antikörpern von syphilitischen Patienten, wobei die immunologischen Daten mittels eines *home-made ELISA* mit F1 und F2 (in Diethylether) als Antigen ermittelt wurden, während unsere Ergebnisse auf Immunoblots beruhen. In diesem Zusammenhang sei zu erwähnen, daß die Glykolipide aufgrund ihrer Chemie und ihrer hohen Konzentration im Gesamtlipid häufig Antikörper unspezifisch gebunden haben. Dieses Problem stellte sich uns beim Immunoblotting sowohl auf dem Immobilon-Papier auch auf HPTLC-Platten. Um die unspezifischen Bindungen zu eliminieren, haben wir die Blockierung der freien Bindungsstellen optimiert durch

- a) Blockierung mit 10%igem Kälberserum in 0.1 M EDTA
- b) Blockierung bei 4 °C und
- c) Blockierung über Nacht

Durch diese verbesserte Art der Blockierung war es möglich die unspezifischen Antikörperbindungen weitestgehend zu eliminieren.

Die nachgewiesene Kreuzreaktivität bei Wheeler [45] könnte eventuell bedingt sein durch unspezifische Antikörperbindungen je nach Wahl der Blockierungsmethode. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten aber auch zurückzuführen sein auf die jeweilige Art der Extraktion und Aufreinigung der Lipidantigene. Die Glykolipide in dieser Arbeit wurden durch eine optimierte HPTLC sehr sauber chromatographiert und anschließend über Säulenchromatographie aufgereinigt. Das Resultat war ein hochaufgereinigtes Glykolipidantigen, wodurch Fehlanalysen minimal gehalten wurden.

Die Phospholipide von *B. burgdorferi* zeigten keine Reaktionen mit Seren von Lyme Borreliose Patienten und sind somit nicht als antigen anzusehen. Auch die Phospholipide von *T. pallidum* zeigen keine Antigenität mit Ausnahme von Cardiolipin. Cardiolipin-Antikörper können bei der Syphilis im VDRL-Test nachgewiesen werden [210-214, 221]. Das Phospholipid-Hapten Cardiolipin ist alleine nicht in der Lage Antikörper zu binden, aber durch Komplexierung mit Cholesterin und Phosphatidylcholin wird dessen Antigenität verstärkt und es können sich Antigen-Antikörper-Komplexe bilden. Dieses Phänomen wird im VDRL-Test ausgenutzt, wo komplexiertes Cardiolipin als Antigen dient. Der VDRL-Test ist ein quantitativer Test, der vornehmlich zur Verlaufskontrolle der Syphilis und zur Detektion von syphilitischen Reinfektionen dient. Cardiolipin konnte bei *B. burgdorferi* nicht nachgewiesen werden, aber dafür Phosphatidylglycerol, welches chemisch gesehen ein „halbes Molekül“ Cardiolipin darstellt (Di-Phosphatidylglycerol). Einen solchen Test zur Verlaufskontrolle gibt es noch nicht bei der Lyme Borreliose. Daher wollten wir prüfen, ob es möglich ist, analog zum VDRL-Test die Antigenität der Borrelien-Phospholipide durch Komplexierung zu erhöhen und somit einen Test zur Verlaufskontrolle zu etablieren. Wir konnten zeigen, daß tatsächlich nur das komplexierte Cardiolipin mit den Syphilis Seren reagierte, während unkomplexiertes Cardiolipin und die komplexierten Borrelien-Phospholipide keinerlei Reaktion mit den Seren zeigten. Eine Steigerung der Antigenität der Borrelien-Phospholipide durch Komplexierung konnte nicht erzielt werden.

Mackworth-Young [220] beschrieb Anticardiolipin-Antikörper bei Lyme Borreliose Patienten und auch Garcia-Monco [148] konnte bei einer Vielzahl von Neuroborreliose Patienten Anticardiolipinantikörper der IgG-Klasse nachweisen. Diese Resultate konnten wir nicht bestätigen. Bei *B. burgdorferi* konnte kein Cardiolipin nachgewiesen werden und somit können bei einem Borreliose-Patienten per se auch keine Antikörper dagegen induziert werden. Auch unsere getesteten Lyme Borreliose Seren zeigten keine Reaktion mit dem

Cardiolipin von *T. pallidum*. Einen positiven Cardiolipin-Titer bei einem Borreliosepatienten konnten wir nur bei gleichzeitiger Infektion mit *T. pallidum* feststellen.

Aufgrund dieser Resultate scheint die Entwicklung eines Tests zur Verlaufskontrolle der Borreliose auf Basis von Phospholipiden eher unwahrscheinlich. Die Glykolipide eignen sich nicht als Antigene für eine Verlaufskontrolle, da sie in jedem Stadium der Lyme-Borreliose vorhanden sind und auch nach abgelaufener Borreliose noch detektiert werden können.

*B. burgdorferi* kann sich an viele verschiedene Zelltypen binden [209, 222, 223]. Durch diese unspezifische Adhäsionsspezifität ist der Erreger in der Lage in Gewebe verschiedenster Organe einzudringen. Eine Erklärung für diese unspezifische Adhäsion wäre, daß *B. burgdorferi* Bindungsstellen (Rezeptoren) benutzt, die auf den meisten Zellen vorhanden sind. Glykosphingolipide sind auf vielen Arten von Zellen vorhanden und spielen sowohl als Rezeptoren für Bakterien als auch bei der zellulären Signaltransduktion [224] eine wichtige Rolle.

Weller et al. [146, 147] konnten bei Patienten mit Neuroborreliose Antikörper gegen Ganglioside nachweisen. Ganglioside sind Sphingolipide mit mehreren Zuckereinheiten am C1 der Spingoid-Base und kommen in der Plasmamembran von Nervengewebszellen vor. Es wurden Antikörper hauptsächlich gegen die Ganglioside GM1, GD1b und GT1b nachgewiesen, aber auch gegen andere Ganglioside konnten Antikörper detektiert werden. Aufgrund dieser mangelnden Spezifität der Gangliosid-Antikörper war es fraglich, ob diese Gangliosid-Antikörper die Verbindung zwischen *B. burgdorferi* Infektion und Neuroborreliose darstellen.

Garcia-Monco et al. [143] konnten zeigen, daß für die Adhäsion von *B. burgdorferi* an Zelloberflächen von Neuralzellen, Galaktocerebroside (GalCer) als Bindungsstellen dienten. Dabei war die Adhärenz an GalCer häufiger als an Glukocerebrosid oder Spingosin und war inhibierbar durch Anti-GalCer-Antikörper. Auch *T. phagedenis* Reiter und *B. hermsii* waren in der Lage an GalCer zu binden. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl bei Neuroborreliose Patienten als auch bei Syphilitikern IgM-Antikörper gegen Ganglioside, vornehmlich mit einer terminalen Gal ( $\beta$ 1-3) GalNac Sequenz (GM1, GD1b), nachweisbar waren. Es wurde vermutet, daß diese Antikörper entweder als Immunantwort auf eine Infektion des ZNS durch *B. burgdorferi* entstanden oder das Resultat einer Kreuzreaktion durch *B. burgdorferi* darstellten. Ausgehend von dieser Information immunisierten Garcia-Monco et al. [149] Laborratten sowohl mit einem nicht-proteinhaltigen Chloroform-Methanol-Extrakt (CME) von *B. burgdorferi* als auch mit nativen Glykosphingolipiden und konnten jeweils eine Antikörperproduktion feststellen. Die Lipid-Antikörper, induziert durch den CME von *B. burgdorferi*, richteten sich gegen Ganglioside, hauptsächlich Asialo-GM1 und GM1.

Umgekehrt erkannten die Antikörper, induziert durch Glykosphingolipide, antigene Determinanten von *B. burgdorferi*. Dieses Ergebnis deutete auf eine bidirektionale Kreuzantigenität zwischen Borrelienlipiden und Glykosphingolipiden. Die kreuzreagierenden Antikörper gehörten vornehmlich der IgM-Klasse an und konnten in den Ranvierschen Knoten von peripheren Nerven bei infizierten Ratten nachgewiesen werden. Diese Resultate belegen, daß die potentiell autoreaktiven Gangliosid-Antikörper einen mikrobiologischen Ursprung haben könnten. Ein solcher Zusammenhang ist für die Induktion von Antikörpern gegen GM1 nach Infektion mit *C. jejuni* bekannt [226]. Dabei stellte man fest, daß die Entstehung der kreuzreagierenden Antikörper auf das LPS von *C. jejuni* zurückzuführen war. Dessen O-Antigen wies ähnliche bzw. identische Zuckersequenzen wie GM1 auf.

In diesem Zusammen sollte erwähnt werden, daß bei einer Vielzahl von Patienten mit einem Guillain-Barre-Syndrom und nachweisbaren Anti-GM1-Antikörpern, anamnestisch eine Infektion mit *C. jejuni* vorgelegen hatte [227].

Im Fall von *B. burgdorferi* könnten die kreuzreagierenden Antikörper, welche sich speziell gegen Ganglioside mit terminaler Galaktose richten, auf die in dieser Studie nachgewiesenen Glykolipide zurückzuführen sein. Wir konnten zeigen, daß es sich bei den Glykolipiden um  $\alpha$ -Galaktosylglycerolipide handelte, die antigen waren und die Antigenität auf die Galaktose zurückzuführen war. Die Galaktolipide könnten also der Ursprung für die kreuzreagierenden Gangliosid-Antikörper sein und damit indirekt eine Rolle bei der Pathogenese der Neuroborreliose spielen. Sie scheinen aber nicht nur bei dieser mehr autoreaktiven Entwicklung der Neuroborreliose eine Rolle zu spielen, sondern könnten auch direkt bei der lokalen Entzündung von neuronalen Zellen beteiligt sein.

*B. burgdorferi* kann sich an Neurone, Glia- und Schwannsche Zellen anheften [176, 222]. Als spezifische Bindungsstelle ist Galaktocerebrosid anzusehen, ein Glykosphingolipid, welches die Hauptkomponente bei Myelin darstellt. Unbekannt dagegen ist bisher der entsprechende Rezeptor bei *B. burgdorferi*. Aufgrund der Bindung an Galaktocerebroside, müßte es sich bei dem Rezeptor nach Meinung von Kaneda et al. [139] um ein Ceramidmonohexosid handeln. Bisher konnten 3 Proteine gefunden werden, die eine Rolle bei der Bindung an Glykosphingolipiden spielen: das 67 kDa Protein, 62 kDa Hsp60 und das 41 kDa Flagellin. Die Oberflächenlipoproteine OspA, OspB und OspC scheinen bei der Adhäsion an Glykosphingolipiden keine Rolle zu spielen [139]. Nach Adhäsion von *B. burgdorferi* an Oligodendroglia- oder Schwannschen Zellen können diese IL-6 und TNF- $\alpha$  produzieren und so eine lokale Entzündung mit Verletzung der neuronalen Zellen hervorrufen [176, 225].

Das Galaktolipid könnte aber auch direkt durch Aktivierung von Makrophagen eine Entzündung der Gliazellen hervorrufen. Eine solche Makrophagenaktivierung ist für die Lipide von *Borrelia burgdorferi* schon nachgewiesen [228].

Die Glykolipide von *B. burgdorferi* scheinen aber nicht nur bei der Pathogenese der Neuroborreliose eine Rolle zu spielen, sondern könnten auch bei der Entstehung der Arthritis beteiligt sein. Erst kürzlich fanden Kaneda et al. Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Galaktoceramidbindung bei der Induktion einer Arthritis durch Borrelien [145].

Die in dieser Studie erstmalig chemisch identifizierten Galaktolipide scheinen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Lyme Borreliose zu spielen. Weiterführende Arbeiten in unserem Labor haben gezeigt, daß alle Spezies der Gattung *Borrelia burgdorferi* sensu lato identische Galaktolipide aufwiesen. Aufgrund dieser Präsenz in den getesteten *B. burgdorferi* Stämmen und der fehlenden Kreuzreaktivität zu *T. pallidum*, könnten diese Galaktolipide als Antigene in der Diagnostik der Lyme Borreliose und als potentielle Kandidaten für eine Vakzine eingesetzt werden.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Lipide von *Borrelia burgdorferi* B31 strukturell und immunologisch charakterisiert.

Der Lipidanteil von *B. burgdorferi* betrug 25 – 30% des Gesamtrockengewichts und ist damit vergleichbar hoch mit dem Lipidanteil von *Treponema* und *Spirochaeta*.

Die Lipide konnten mittels HPTLC in 11 Lipidfraktion chromatographisch aufgetrennt werden. Durch chemische Färbungen der Fraktionen konnten zwei Glykolipide und zwei Phospholipide nachgewiesen werden. Die Glykolipide hatten mit 50% den größten Anteil am Gesamtlipid, gefolgt von den Phospholipiden mit jeweils 10%. Insgesamt machten diese vier Hauptfraktionen etwa 70% der Gesamtlipide aus. Bei den beiden Borrelien-Glykolipiden handelte es sich jeweils um Monoglykosyldiglyceride. Galaktose war das einzige nachweisbare Monosaccharid im Lipidextrakt von *B. burgdorferi*. Mittels massenspektrometrischer und gaschromatographischer Methoden konnten die Glykolipide als  $\alpha$ -Galaktosyldiacylglycerol mit jeweils unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung identifiziert werden. Wir konnten zeigen, daß es sich bei dem Kohlenhydratanteil der beiden Glykolipide um terminale  $\alpha$ -gebundene Galaktose handelte. Oxidation dieser Galaktose verdeutlichte dessen Bedeutung als einzige relevante Bindungsstelle für Antikörper gerichtet gegen Lipide von *B. burgdorferi* B31. Die beiden Phospholipide von *B. burgdorferi* konnten als Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglycerol (PG) identifiziert werden.

Die Fettsäureanalyse der Lipide von *B. burgdorferi* ergab zu je etwa 30% die gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (C16:0) und Stearinsäure (C18:0), während die ungesättigten Fettsäuren mit 30.6% Ölsäure (C18:1) und 11.2% Linolsäure (C18:2) vertreten waren. Immunologische Untersuchungen mit Seren von Patienten im Früh-Stadium oder mit akuter, chronischer oder abgelaufener Lyme Borreliose zeigten positive Reaktionen aller Seren nur mit den beiden Glykolipiden, die restlichen 9 Lipidfraktion waren an Immunreaktionen nicht beteiligt. Seren von syphilitischen Patienten zeigten keine Reaktion mit den Lipiden, weder mit den Glykolipiden noch mit den Phospholipiden. Die Antikörper von Borreliose-Patienten richten sich sehr spezifisch nur gegen die Glykolipide von *B. burgdorferi*. Es ergab sich kein Anhalt für eine Kreuzreaktivität zwischen den Lipiden von *B. burgdorferi* und *T. pallidum*. Diese Feststellungen sind sehr bedeutsam im Hinblick auf einen Einsatz dieser Glykolipide für die Diagnostik der Lyme Borreliose. Die Phospholipide von *B. burgdorferi* zeigten keine Reaktionen mit Seren von Lyme Borreliose Patienten und sind somit nicht als antigen anzusehen. Eine Steigerung der Antigenität der Borrelien-Phospholipide durch Komplexbildung mit Cholesterin und Lecithin analog zum VDRL-Antigen der Syphilis-Diagnostik konnte nicht erzielt werden.

Die in dieser Studie erstmalig chemisch identifizierten Galaktolipide scheinen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Lyme Borreliose zu spielen. Weiterführende Arbeiten in unserem Labor haben gezeigt, daß alle Spezies der Gattung *Borrelia burgdorferi* sensu lato identische Galaktolipide aufwiesen. Aufgrund der Präsenz in den getesteten *B. burgdorferi* Stämmen und der fehlenden Kreuzreaktivität zu *T. pallidum*, könnten diese Galaktolipide als Antigene in der Diagnostik der Lyme Borreliose und als potentielle Kandidaten für eine Vakzine in Betracht kommen.

## 6. Literatur

1. Burgdorfer W, Barbour AG. Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science* 1982;261:1317-1319
2. Steere AC. Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 1989;321:586-597
3. Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bact.* 1984;34:496-497
4. Johnson RC, Hyde FW, Rumpel CM. Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 1984;57:529-537
5. Canale-Parola E. Order spirochaetales. In: Kiege NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams & Williams:38-39
6. Karlsson M. Comparison of western blot and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1989;8:871-877
7. Ma B. Serodiagnosis of lyme borreliosis by western immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *B. burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 1992;30:370-376
8. Magnarelli LA, Anderson JF. Enzyme-linked immunoabsorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to *B. burgdorferi*. *Am. J. Epidemiol.* 1988;127:813-815
9. Russell H, Sampson JS, Schmidt GP. Enzyme-linked immunoabsorbent assays and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 1984;149:465-470
10. Norris SJ, Carter JC, Howell KJ, Barbour AG. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of Osp D, a surface exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect. Immun.* 1992;60:4662-4672
11. Dressler F, Steere AC. Western blotting in the serodiagnostic of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 1993;167:392-400
12. Brandt ME, Riley BS, Radolf JD, Norgard MV. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect. Immun.* 1990;58:983-991
13. Chamberlain NR, Brandt ME, Erwin AL, Radolf JD, Norgard MV. Major integral membrane protein immunogens of *Treponema pallidum* are proteolipids. *Infect. Immun.* 1989;57:2872-2877
14. Schouls LM, Mout R, Dekker J, Emden JDAv. Characterization of lipid-modified immunogenic lipids of *Treponema pallidum* expressed in *Escherichia coli*. *Microbiol. Pathol.* 1989;7:175-188

15. Swancutt MA, Radolf JD, Norgard MV. The 34-kD membrane immunogen of *Treponema pallidum* is a lipoprotein. *Infect. Immun.* 1990;58:384-392
16. Bergstrom S, Barbour AG, Bundoc VG. Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, Osp A and Osp B of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 1989;3:479-486
17. Fuchs R, Jauris F, Lottspeich F, Praec-Mursic V, Wilske B, Soutschek E. Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22 kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1992;6:503-509
18. Lam TT, Nguyen TPK, Montgomery RR, Kantor FS, Fikrig E, Flavell RA. Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect. Immun.* 1994;62:290-298
19. Wilske B, Praec-Mursic S, Jauris A, Hofmann A, Pradel I, Soutschek E. Immunological and molecular polymorphisms of Osp C, and immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 1993;61:2182-2191
20. Akins DR, Purcell BK, Mitra M, Norgard MV, Radolf JD. Lipid modification of the 17-kD membrane immunogen of *Treponema pallidum* determines macrophage activation as well as amphiphilicity. *Infect. Immun.* 1993;61:1202-1210
21. Chamberlain NR, DeOgny L, Slaughter C, Radolf JD, Norgard MV. Acylation of the 47-kD major membrane immunogen of *Treponema pallidum* determines its hydrophobicity. *Infect. Immun.* 1989;57:2878-2885
22. Purcell BK, Swancutt MA, Radolf JD. Lipid modification of the 15-kD major membrane immunogen of *Treponema pallidum*. *Molec. Microbiol.* 1990;4:1371-1379
23. Weigel LM, Brandt ME, Norgard MV. Analysis of the N-terminal region of the 47-kD integral membrane lipoprotein of *Treponema pallidum*. *Infect. Immun.* 1992;60:1568-1576
24. Ma Y, Weis JJ. *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins Osp A and Osp B possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties. *Infect. Immun.* 1993;61:3843-3853
25. Radolf JD, Norgard MV, Brandt ME, Isaacs RD, Thompson PA, Beutker B. Lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* activate cachectin/tumor necrosis factor synthesis: analysis using a CAT reporter construct. *J. Immunol.* 1991;147:1968-1974



26. Riley BS, Oppenheimer-Marks N, Hansen EJ, Radolf JD, Norgard MV. Virulent *Treponema pallidum* activates human vascular endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 1992;165:484-493
27. Erdile LF, Brandt MA, Warakomski DJ, Westrack GJ, Sadziene A, Barbour AG, Mayes JP. Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* Osp A. *Infect. Immun.* 1993;61:81-90
28. Deres K, Schild H, Wiesmüller KH, Jung G, Rammensee HG. In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* 1989;342:561-564
29. Hausschildt S, Hoffman P, Beuscher HU, Dufhues G, Heinrich P, Wiesmüller KH. Activation of bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopeptide: cytokine production, phagocytosis, and Ia expression. *Eur. J. Immunol.* 1990;20:63-68
30. Metzger R, Jung G, Bessler WG, Hoffmann P, Strecker M, Lieberknecht A, Schmidt U. Lipopeptides containing 2-(palmitoylamino)-6,7-bis(palmitoxy)heptanoic acid: synthesis, stereospecific stimulation of B lymphocytes and macrophages, and adjuvant activity in vivo and in vitro. *J. Med. Chem.* 1991;34:1969-1974
31. Aguero-Rosenfeld MA. Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients treated with culture-confirmed erythema migrans. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34:1-9
32. Wilske B. Antigenic variation of *Borrelia burgdorferi*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1988;26:126-143
33. Marconi RT, Garon CF. Variability of osp genes and gene products among species of Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* 1993;61:2611-2617
34. Schwan TG, Warren GS. Factors influencing the antigenic reactivity of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Scand. J. Infect. Dis.* 1991;77:94-101
35. Cinco M, Banfi E, Panfili E. Leptospiral lipopolysaccharide presence in the outer envelope: electrophoretic and immunological specificity. *Zbl. Bakt. Hyg.* 1988;269:277-283
36. Adler B, Ballard SA, Miller SJ, Faine S. Monoclonal antibodies reacting with serogroup and serovar specific epitopes on different lipopolysaccharide subunits of *Leptospira interrogans* serovar pomona. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1989;47:213-218

37. Vinh T, Shi M, Adler B, Faine S. Characterization and taxonomic significance of lipopolysaccharides of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J. Gen. Microbiol.* 1989;135:2663-2673
38. Halter MR, Joens LA. Lipopolysaccharides from *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Infect. Immun.* 1988;56:3152-3156
39. Takayama K, Rothenberg RJ, Babour AG. Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 1987;55:2311-2313
40. Cinco M, Banfi E, Balanzin D, Godeas C, Panfili E. Evidence for (lipo)oligosaccharides in *Borrelia burgdorferi* and their serological specificity. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1991;76:33-38
41. Galanos C, Lüderitz O, Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 1969;9:245-249
42. Habicht GS, Beck G, Coleman JL. *Borrelia burgdorferi* lipopolysaccharides and its role in the pathogenesis of Lyme disease. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg.* 1985;263:137-141
43. Tsai CM, Frasch CA. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1982;119:115-119
44. Eiffert H, Lotter H, Jarecki-Khan K, Thompsen R. Identification of an immunoreactive non-proteinaceous component in *Borrelia burgdorferi*. *Med. Microbiol. Immunol.* 1991;180:229-237
45. Wheeler CM, Monco JCG, Benach JL, Golightly MG, Habicht GS, Steere AC. Nonprotein antigens of *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 1993;167:665-674
46. Beck G, Habicht GS, Benach JL, Coleman JL. Chemical and biological characterization of a lipopolysaccharide extracted from the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *J. Infect. Dis.* 1985;152:108-117
47. Radolf JD, Goldberg MS, Bourell K, Baker SI, Jones JD, Norgard MV. Characterization of outer membranes isolated from *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Infect. Immun.* 1995;63:2154-2163
48. Raoult D, Hechemy E, Baranton G. Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis and leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 1989;27:2152-2155
49. Livermore BP. Lipids of the spirochetes: Comparison of the lipids of several members of the genera *Spirocheta*, *Treponema* and *Leptospira*. *J. Bact.* 1974;120:1268-1273

50. Herbert MM, Tze-Ken Y, Jenkin HM. Alk-1-enyl ether phospholipids (plasmalogens) and glycolipids of *Treponema hyodysenteriae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1980;618:273-281
51. Livermoore BP, Johnson RC. Isolation and characterization of a glycolipid from *Treponema pallidum*, Kazan 5. *Biochim. Biophys. Acta* 1970;210:315-318
52. Radolf JD, Robinson EJ, Bourell KW. Characterization of outer membranes isolated from *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Infect. Immun.* 1995;63:4244-4252
53. Pickett J, Kelly R. Lipid catabolism of relapsing fever borreliae. *Infect. Immun.* 1974;9:279-285
54. Livermoore BP, Bey RF, Johnson RC. Lipid metabolism of *Borrelia hermsi*. *Infect. Immun.* 1978;20:215-220
55. Cacciapuoti B, Ciceroni L, Barbini DA. Fatty acid profiles in the family Leptospiraceae. *Zbl. Bakt.* 1990;274:16-27
56. Cho SN, Uhm JR, Kim JD. Comparative analysis of lipopolysaccharide and lipid antigens of *Leptospira interrogans* serovars. *Yonsei Med. J.* 1992;33:24-31
57. Ono E, Takase H, Naiki M, Yanagawa R. Purification, characterization and serological properties of a glycolipid antigen reactive with a serovar specific monoclonal antibody against *Leptospira interrogans* serovar canicola. *J. Gen. Microbiol.* 1987;133:1329-1336
58. Masuzawa T, Nakamura R, Shimizu T, Iwamoto Y, Morita T, Yanagihara Y. Immunological characteristics of the glycolipid antigen of *Leptospira interrogans* serovar lai. *Infect. Immun.* 1989;57:2502-2506
59. Moribayashi A, Goto N, Arimitsu Y, Himeno K, Tatsuki S. Lipids and fatty acids of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni virulent strain shibaura. *Jpn. J. Sci. Biol.* 1991;44:87-97
60. Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme Disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 1984;57:521-525
61. Kelly R. Cultivation of *Borrelia hermsii*. *Science* 1971;173:443-444
62. Stoenner HG. Biology of *Borrelia hermsii* in Kelly medium. *Appl. Microbiol.* 1974;28:540-543
63. Kates M. Techniques in lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. In: Work TS, Work E, eds. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Vol. 3. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1972:269-610

- 
64. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959;37:911-917
  65. Williams MA, McCluer RH. The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J. Neurochem.* 1980;35:266-269
  66. Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, Epps DE. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J. Lipid Res.* 1985;26:135-140
  67. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685
  68. Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979;76:4350-4354
  69. Hensel U, Wellensiek HJ, Bhakdi S. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis immunoblotting as a serological test in the diagnosis of syphilic infections. *Am. Soc. of Microbiol.* 1985;21:82-87
  70. Alfen I, Wellensiek HJ. Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose und der Syphilis. *Lab. Med.* 1994;18:12-19
  71. Dittmer JC, Lester RL. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.* 1964;5:126-127
  72. Baumeister S, Dennis RD, Klünder R, Schares G, Zahner H, Geyer E. Litomosoides carinii: macrofilariae-derived glycolipids - chromatography, serology and potential in the evaluation of anthelmintic efficacy. *Parasite Immunol.* 1994;16:629-641
  73. Geyer R, Geyer H, Kühnhardt S, Mink W, Stirm S. Capillary gas-chromatography of methylhexitol acetates obtained upon methylation of N-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 1982;121:263-274
  74. Paz-Parente J, Cardon P, Leroy Y, Montreuil J, Fournet B, Ricard G. A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methyl-sulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* 1985;141:41-47
  75. Geyer R, Geyer H. Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques. *Methods Enzymol.* 1994;230:86-108
  76. Dell A. Preparation and desorption mass spectrometry of permethyl and peracetyl derivatives of oligosaccharides. *Methods Enzymol.* 1990;193:647-660

- 
77. Hoffman J, Lindberg B, Svensson S. Determination of the anomeric configuration of sugar residues in acetylated oligo- and polysaccharides by oxidation with chromium trioxide in acetic acid. *Acta Chem. Scand.* 1972;26:661-666
  78. Gaver RC, Sweeley CC. Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long-chain bases by gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1965;42:294-298
  79. Livermore BP, Johnson RC. Lipids of the Spirochaetales: comparison of the lipids of several members of the genera Spirochaeta, Treponema and Leptospira. *J. Bacteriol.* 1974;120:1268-1273
  80. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, Vugt Rv, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Wathley L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fujii C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of a lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1997;390:580-586
  81. Livermoore BP, Johnson RC. Isolation and characterization of a glycolipid from *Treponema pallidum*, Kazan 5. *Biochem. Biophys. Acta* 1970; 210; 315-318
  82. Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from Ixodes ovatus in Japan. *Microbiol Immunol.* 1993; 37; 843-848
  83. Marconi RT, Liveris D, Schwartz I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphisms patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme Disease Spirochetes: Phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33; 2427-2434
  84. Wang G, Van Dam AP, Le Fleche A, Postic D, Peter O, Baranton G, De Boer R, Spanjaard L, Dankert J. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic group VS116 and M19)
  85. Assous MV, Postic D, Paul G, Nevot P, Baranton G. Individualisation of two new genomic groups among American *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *FEMS Microbiol Lett.* 1994; 121; 93-98
  86. Postic D, Marti Ras N, Lane RS, Henderson M, Baranton G. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN 127)

87. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175; 720-731
88. Finean J, Coleman R, Mitchell RH. *Membranes and their cellular functions*. 3<sup>rd</sup> Edt. Blackwell Scientific Publications 1984, Oxford
89. Rothman JE, Lenard J. Membrane asymetry. *Science* 1977; 195; 743-753
90. Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of lipids, Lipoproteins and membranes*. New Comprehensive Biochemistry 1991, Vol. 20, Elsevier Science Publishing Co., Inc. NY
91. Wiegandt H. Glycosphingolipids. *Adv. Lipid Res.* 1971; 9, 249-289
92. Hakomori SI. Glycosphingolipide. *Spektrum der Wissenschaft* (Juli); 90-100
93. Sastry PS. Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.* 1985; 24; 169-176
94. Nagai Y. Gangliosides as signalling molecules in neural functions. *Glycoconj. J.* 1995; 12; 544
95. Ishizuka I Yamakawa T. Glycoglycerolipids. *Glycolipids* (H. Wiegandt, Ed.) 1985; 101-198; Elsevier, Amsterdam
96. Schwarting GA, Gajewski A. Glycolipids of murine lymphocyte subpopulations: a defect in the levels of sialidase-sensitive sialosylated asialo GM1 in beige mouse lymphocytes. *J. Immunol.* 1981; 126; 2403-2407
97. Hakomori SI. Bloodgroup ABH and Ii antigens of human erythrocytes: chemistry, polymorphism, and their, developmental change. *Sem. Haematol.* 1981, 18; 39-62
98. Watkins WM. Biosynthesis: molecular basis of antigenic specificity in the ABO, H and Lewis blood group system. *Glycoproteins* (J. Montreuil, H. Schachter, J.F.G. Vliegthart, Ed.) 1995; 313-390
99. Vanier MT. Lipid changes in Niemann-Pick disease type C brain: personal experience and review of the literature. *Neurochem Res.* 1999 Review; 24(4); 481-489.
100. Geyer R, Geyer H, Kühnhardt S, Mink W Stirm S. Methylation analysis of complex carbohydrates in small amounts: Capillary gas chromatography – mass fragmentography of methylalдитiol acetates obtained from N-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 1983; 133; 197-207
101. Afzelius A. Erythema chronicum migrans. *Acta Derm. Venereol.* (Stockholm) 1921; 2;120-5

- 
102. Rille JH. Acrodermatitis chronica atrophicans. Arch. Dermatol. Syph. (Berlin) 1898; 45;423
  103. Herxheimer K, Hartmann K. Ueber acrodermatitis chronica atrophicans. Arch. Dermatol. Syph. 61; 57-76
  104. Lipschütz B. Ueber eine seltene Erythemform (*Erythema chronicum migrans*). Arch. Dermatol. Syph. 1914; 118; 349-356.
  105. Hellerström S. Beitrag zur Pathogenese des Erythema chronicum migrans Afzelii. Acta Derm Venereol. (Stockh) 1934; 14; 517
  106. Garin CH, Bujadoux CH. Paralysie par les tiques. J. Med. Lyon 1922; 71; 765-767
  107. Hellerström S. Erythema chronicum migrans Afzelii. Acta Derm Venereol. (Stockh) 1930; 11; 315-321
  108. Bannwarth A. Zur Klinik und Pathogenese der chronische lymphozytären Meningitis. Arch. Psych. 1944; 117; 161-185 und 682-717
  109. Hörstrup P, Ackermann R. Durch Zecken übertragene Meningopolyneuritis (Garin-Bujadoux-Bannwarth). Fortschr. Neurol. Psych. 1973; 41;583-606
  110. Bäfverstedt B. Ueber Lymphadenosis benigna cutis. Eine klinische und pathologisch-anatomische Studie. Acta. Derm. Venereol. (Stockh) 1943; 24; suppl. 11; 1-102
  111. Jordan P, Holtschmidt J. Traumatisches Zeckenbiß-Lymphozytom und Erythema chronicum migrans. Hautarzt 1951; 2; 397-401
  112. Bianchi E. Die Penicillinbehandlung der Lymphozytome. Dermatologica 1950; 100; 270-273
  113. Paschoud JM. Die Lymphadenosis benigna cutis als übertragbare Infektionskrankheit I-III. Hautarzt 1958; 9; 153-165, 263-269 und 311-315
  114. Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM. Lyme Arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. Arthr. Rheum. 1977; 20: 7-17
  115. Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. 1984; 57; 521-525
  116. Benach JL, Bosler EM, Hanrahan JP, Coleman JL, Habicht JS, Bast TF, Cameron DJ, Ziegler JL, Barbour AG, Burgdorfer W, Edelmann R, Kaslow RA. Spirochetes isolated from blood of two patients with Lyme disease. New Engl. J. Med. 1983; 308; 740-742
  117. Holt, SC. Anatomy and chemistry of spirochetes. Microbiol. Rev. 1978;42; 144-160

118. Hovind-Hougen, K. Ultrastructure of spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* and *Ixodes dammini*. Yale J. Biol. 1984; 57; 543-548
119. Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. 1986; 50; 381-400
120. Barbour AG, Hayes SF, Heiland RA, Schrupf ME, Tessier SL. A borrelia-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. Infect. Immun. 1986; 52; 549-554
121. Adam T, Gassmann GS, Rasiah C, Göbel UB. Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from various sources. Infect. Immun. 1991; 59; 2579-2585
122. Baranton G, Portic D, Girons JS. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. Novii, and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int. J. syst. Bacteriol. 1992; 42; 378-383
123. Belfaiza J, Postic D, Bellenger E, Baranton G, Girons JS. Genomic fingerprinting of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 1993; 31; 2873-2877
124. Canica MM, Nato F, Du Merle L, Mazie JC, Baranton G, Postic D. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. Nov. Associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. J. Infect. Dis. 1993; 25; 441-448
125. Wallich R; Helmes C, Schaible UE, Lobet Y, Moter SE, Kramer MD, Simon MM. Evaluation of genetic divergence among *Borrelia burgdorferi* isolates by use of Osp A, fla, HSP 60 and HSP 70 probes. Infect. Immun. 1992; 60; 4856-4866
126. Callister SM, Agger WA, Schell RF, Johnson RC, Ellingson JLE. Effects of bovine serum albumin on the ability of Barbour-Stoenner-kelly Medium to detect *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 1990; 28; 363-365
127. Bergmann J, Liebisch A, Pohlmeier K. Borreliose – zum Vorkommen der einheimischen Borreliose bei Zecken, Wild- und Haustieren in einem niedersächsischen Moor. J. für den Veterinär 1992; 2; 12-15
128. Aeschlimann A, Chamot E, Gigon F, Jeanneret JP, Kessler D, Walther C. *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. Zentralbl. Bakt. Hyg. 1986; A263; 450-458
129. Anderson JF. Epizootiology of *Borrelia* in *Ixodes* tick vectors and reservoir hosts. Rev. Infect. Dis. 1989; 11, suppl. 6, 1451-1458
130. Walter G, Liebisch A. Untersuchungen zur Biologie und Verbreitung von Zecken in Norddeutschland. Z. Angew. Zool. 1980; 67; 449-476
131. Kurtenbach K, Dizij A, Seitz HM, Margos G, Moter SE, Kramer MD, Wallich R, Schaible UE, Simon MM. Differential immune responses to *Borrelia burgdorferi* in



- European wild rodent species influence spirochete transmission to *Ixodes ricinus*. Infect. Immun. 1994; 62; 5344-5352
132. Liebisch A, Schmidt C, Friedhoff KT. Zeckenbefall und durch Zecken übertragene Infektionen bei kleinen Haustieren unter Berücksichtigung der Lyme Borreliose. Der praktische Tierarzt 1993; 23; 112-115
133. Liebisch A. Biologie und Ökologie der Zecken. Horst H. (Hrsg.): Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier. Perimed Erlangen 1991; 31-47
134. Burgdorfer W, Hayes SF, Corwin D. Pathophysiology of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi* in Ixodes ticks. Rev. Infect. Dis. 1989; 11; suppl. 6; 1442-1450
135. Gern L, Aeschlimann A. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* during blood meal. IV International Conference on Lyme Borreliosis, Stockholm 1990 (Abstr.)
136. Piesman J, Oliver JR, Sinsky R. Growth kinetics of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* in vector ticks (*Ixodes dammini*). Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990; 42; 352-357
137. Piesman J, Mather TN, Sinsky R, Spielman A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. J. Clin. Microbiol. 1987; 25; 557-558
138. Kaneda K, Masuzawa T, Yasugami K, Suzuki T, Suzuki Y, Yanagihara Y. Glycosphingolipid-binding protein of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Infect. Immun. 1997; 65 (8); 3180-3185
139. Backenson PB, Coleman JL, Benach JL. *Borrelia burgdorferi* shows specificity of binding to glycosphingolipids. Infect. Immun. 1995; 63 (8); 2811-2817
140. Norgard MV, Riley BS, Richardson JA, Radolf JD. Dermal inflammation elicited by sythetic analogs of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. Infect. Immun. 1995; 63 (4); 1507-1515
141. Skare JT, Mirzabekov TA, Shang ES, Blanco DR, Erdjument-Bromage H, Bunikis H, Bergstrom S, Tempst P, Kagan BL, Miller JN, Lovett MA. The Oms66 (p66) protein is a *Borrelia burgdorferi* porin. Infect. Immun. 1997; 65 (9); 3654-3661
142. Belisle JT, Brandt ME, Radolf JD, Norgard MV. Fatty acids of *Treponema pallidum* and *B. burgdorferi* lipoproteins. J. Bacteriol. 1994; 176 (8); 2151-2157
143. Garcia-Monco JC, Fernandez Villar B, Rogers RC, Szczepanski A, Wheeler CM, Benach JL. *Borrelia burgdorferi* and other related spirochetes bind to galactocerebroside. Neurology 1992; 42 (7); 1341-1348

144. Katona LI, Beck G, Habicht GS. Purification and immunological characterization of a major low-molecular-weight lipoprotein from *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 1992; 60 (12); 4995-5003
145. Kaneda K, Masuzawa T, Simon MM, Isogai E, Isogai H, Yasugami K, Suzuki T, Suzuki Y, Yanagihara Y. Infectivity and arthritis induction of *Borrelia japonica* on SCID mice and immune competent mice: possible role of galactosylceramide binding activity on initiation of infection. Microbiol. Immunol. 1998; 42 (3); 171-175
146. Weller M, Stevens A, Sommer N, Wietholter H. Are CSF or serum ganglioside antibodies related to peripheral nerve demyelination in neuroborreliosis, Guillain-Barre syndrome, or chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy? Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 1992; 242 (2-3); 122-126
147. Weller M, Stevens A, Sommer N, Dichgans J, Kappler B, Wietholter H. Ganglioside antibodies: a lack of diagnostic specificity and clinical utility? J. Neurol. 1992; 239 (8); 455-459
148. Garcia-Monco JC, Wheeler CM, Benach JL, Furie RA, Lukehart SA, Stanek G, Steere AC. Reactivity of neuroborreliosis patients (Lyme disease) to cardiolipin and gangliosides. J. Neurol. Sci. 1993; 117 (1-2); 206-214
149. Garcia-Monco JC, Seidman RJ, Benach JL. Experimental immunization with *Borrelia burgdorferi* induces development of antibodies to gangliosides. Infect. Immun. 1995; 63 (10); 4130-4137
150. Burgdorfer W. Lyme-Borreliosis. MMW 1989; 131; 91-98
151. Hassler D, Simon MM, Kramer MD. Lyme-Borreliose. Neue Aspekte zum Verständnis von Pathophysiologie und Epidemiologie. Notabene Medici 1989; 718; 333-338
152. Wilske B, Prae-Mursic V, Schierz G. Lyme-Borreliose. Die gelben Hefte 1988; 27; 146-159
153. Ackermann R. Erythema migrans – Borreliose und Frühsommer-meningoenzephalitis. Dtsch. Ärzteblatt 1986; 83; 1765-1774
154. Weber K, Neubert U. Clinical features of early erythema migrans disease and related disorders. Zbl. Bakt. Hyg. 1986; (A263); 209-228
155. Weber K, Schierz G, Wilske B, Prae-Mursic V. Das Lymphozytom – eine Borreliose? Z. Hautkr. 1985; 60; 1585-1598

156. Albrecht S, Hofstadter S, Artsob H, Chaban O, From L. Lymphadenosis benigna cutis resulting from *Borrelia* infection (*Borrelia lymphozytoma*). J. Amer. Acad. Dermatol. 1991; 24; 621-625
157. Horst H. Klinik der *Borrelia burgdorferi*-Infektionen – allgemeiner Überblick. Horst, H.(Hrsg): Einheimische Zeckenborreliose (Lyme – Krankheit) bei Mensch und Tier. Perimed Erlangen 1991; 54-58
158. Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC. Chronic neurologic manifestations of Lyme disease. N. Engl. J. Med. 1990; 323; 1438-1444
159. Kristoferitsch W. Neuropathien bei Lyme-Borreliose. Springer Verlag Wien/New York 1989.
160. Jonsson L, Stiernstedt G, Thomander L. Tick borne *Borrelia* infection in patients with Bell's palsy. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 1987; 113; 303-306
161. McAlister HF, Klementowicz PT, Andrews C, Fisher JD, Feld M, Furman S. Lyme carditis: An important cause of atrioventricular heart block. Ann. Intern. Med. 1989; 110; 339-345
162. Stanek G, Klein J, Bittner R, Glogar D. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. N. Engl. J. Med. 1990; 322; 249-252
163. Jacobson DM, Marx JJ, Dlesk A. Frequency and clinical significance of Lyme seropositivity in patients with isolated optic neuritis. Neurol. 1991; 41; 706-711
164. Duray P, Steere AC. The spectrum of organ and systems pathology in human Lyme disease. Zbl. Bakt. Hyg. 1986; A263; 169-178
165. Bianchi G, Rovetta G, Monteforte P, Fumarola D, Trevisan G, Crovto F, Cimmino MA. Articular involvement in European patients with Lyme disease. A report of 32 Italian patients. Brit. J. Rheumatol. 1990; 29, 178-180
166. Cruz MH, Hansen K, Faarvang KL, Link H. Intrasyovial production of oligoclonal specific antibodies in Lyme arthritis. N. Engl. J. Med. 1990; 322; 1889-1890
167. Kramer MD, Moter SE, Hofmann H, Schaible UE, Simon MM, Wallich R. Symptomatik und Diagnostik der Lyme-Borreliose. Dtsch. Med. Wschr. 1993; 118; 423-427
168. Asbrink E, Brehmer-Anderson E, Hovmark A. Acrodermatitis chronica atrophicans – A spirochetosis. Clinical and histopathological picture based on 32 patients; course and

- relationship to erythema chronicum migrans Afzelius. Amer. J. dermatopath. 1986; 8; 209-219
169. Aberer E, Stanek G, Ertl M, Neumann R. Evidence of spirochetal origin of circumscribed scleroderma (morphea). Acta. Derm. Venereol. (Stockh.) 1987; 67; 225-231
170. Aberer E, Stanek G. Histological evidence for spirochetal origin of morphea and lichen sclerosus et atrophicans. Amer. J. Dermatopath. 1987; 9; 374-379
171. Tuffanelli D. Do some patients with morphea and lichen sclerosus et atrophicans have a *Borrelia* infection? Amer. J. Dermatopath. 1987; 9; 371-373
172. Dickman S. Possible cause found for Lyme arthritis. Science 1998; 281 (5377); 631-632
173. Fendler C, Wu P, Eggens U, Laitko S, Sorenson H, Disler A, Braun J, Sieper J. Longitudinal investigation of bacterium-specific synovial lymphocyte proliferation in reactive arthritis and lyme arthritis. Br. J. Rheumatol. 1998; 37 (7); 784-788
174. Akin E, McHugh GL, Flavell RA, Fikrig E, Steere AC. The immunoglobulin (IgG) antibody response to OspA and OspB correlates with severe and prolonged Lyme arthritis and the IgG response to P35 correlates with mild and brief arthritis. Infect. Immun. 1999; 67 (1); 173-181
175. Linssen WH, Gabreels FJ, Wevers RA. Infective acute tranverse myelopathy. Report of two cases. Neuropediatrics 1991; 22 (2); 107-109
176. Garcia-Monco JC, Benach JL. Mechanisms of injury in Lyme neuroborreliosis. Semin. Neurol. 1997; 17 (1); 57-62
177. Strobino BA, Williams CL, Abid S, Chalson R, Spierling P. Lyme disease and pregnancy outcome: a prospective study of two thousand prenatal patients. Am. J. Obstet. Gynecol. 1993; 169; 367-374
178. Silver RM, Yang L, Daynes RA, Branch DW, Salafia CM, Weis JJ. Fetal outcome in murine Lyme disease. Infect. Immun. 1995; 63 (1); 66-72
179. Liebisch G, Sohns B, Bautsch W. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodes ricinus ticks attached to human skin by PCR. J. Clin. Microbiol. 1998; 36 (11), 3355-3358
180. Eiffert H, Karsten A, Thompsen R, Christen HJ. Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains in Lyme arthritis. Scan. J. Infect. Dis. 1998; 30 (0); 265-268
181. Vasiliu V, Herzer P, Rossler DE, Lehnert G, Wilske B. Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato demonstrated by an ospA-type-specific PCR in synovial fluid

- from patients with Lyme arthritis. *Med. Microbiol. Immunol. (Berlin)* 1998; 187 (2); 97-102
182. von Orelli S, Schnarwyler B, Maurer R, Hirsch H, von Castelberg B. Vulvares pseudolymphom: Nachweis der Infektion mit *Borrelia burgdorferi* mittels Polymerasekettenreaktion. *Gynäkol. Geburtshilfliche Rundsch.* 1998; 38 (3); 143-145
183. Liveris D, Varde S, Iyer R, Koenig S, Bittker S, Cooper D, McKenna D, Nowakowski J, Nadelman RB, Wormser GP, Schwartz I. Genetic Diversity of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients as determined by culture versus direct PCR with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37 (3); 565-569
184. Brettschneider S, Bruckbauer H, Klugbauer N, Hofmann H. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine sample from patients with skin borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (9); 2658-2665
185. Lebech AM, Hansen K, Rutledge BJ, Kolbert CP, Rys PN, Persing DH. Diagnostic detection and direct genotyping of *Borrelia burgdorferi* regular by Polymerase Chain Reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *Mol Diagn.* 1998; 3 (3); 131-141.
186. Pahl A, Kuhlbrandt U, Brunne K, Rollinghoff M, Gessner A. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. *J. Clin Microbiol.* 1999; 37 (6); 1958-1963.
187. Barbour AG, Tessier SL, Todd WJ. Lyme disease spirochetes and ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 1983; 41; 795-804
188. Barbour AG, Tessier SL, Hayes SF. Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* 1984; 45; 94-100
189. Fikrig E, Barthold SW, Marcantonio N, Deponte K, Kantor FS, Flavell RA. Roles of OspA, OspB and flagellin in protective immunity to Lyme borreliosis in laboratory mice. *Infect. Immun.* 1992; 60; 657-661
190. Langermann S, Palaszinski S, Sadziene A, Stover CK, Koenig S. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1995; 372; 552-555
191. Shanafelt M, Anzola J, Soderberg C, Yssel H, Turck CW, Peltz G. Epitopes on the outer surface protein A of *Borrelia burgdorferi* recognized by antibodies and T cells of patients with Lyme disease. *Eur. J. Immunol.* 1992; 148; 218-224

192. Honarvar N, Schaible UE, Wallich R, Simon MM. A 14.000 MW lipoprotein and a glycolipid-structure of *Borrelia burgdorferi* induce proliferation and immunoglobulin production in mouse B cells at high frequencies. *Immunology* 1994; 82; 389-396
193. Weis JJ, Ma Y, Erdile LF. Biological activities of native and recombinant *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A: dependence on lipid modification. *Infect. Immun.* 1994; 62; 4632-4636
194. Comstock LE, Thomas DD. Penetration of endothel cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 1989; 57; 1626-1628
195. Sadziene A, Barbour AG, Rosa PA, Thomas DD. An OspB mutant of *Borrelia burgdorferi* has reduced invasiveness in vitro and reduced infectivity in vivo. *Infect. Immun.* 1993; 61; 3590-3596
196. Sadziene A, Thomas DD, Barbour AG. *Borrelia burgdorferi* mutant lacking Osp: biological and immunological characterization. *Infect. Immun.* 1995; 63; 1573-1580
197. Thomas DD, Comstock LE. Interaction of Lyme disease spirochetes with cultured eucaryotic cells. *Infect. Immun.* 1989; 57; 1324-1326
198. Barbour AG, Heiland RA, Howe TR. Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of north american and european isolates. *J. Infect. Dis.* 1985; 152; 478-484
199. Peter O, Bretz AG. Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. *Zbl. Bakt.* 1992; 277; 28-33
200. Pachner AR, Itano A, Ricalton N. An outer surface protein is a major T cell antigen in experimental Lyme disease in CB6F1 mice. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1991; 636; 393-395
201. Wilske B, Prae-Mursic, Schierz G, Busche KV. Immunochemical and immunological analysis of european *Borrelia burgdorferi* strains. *Zbl. Bakt. Hyg* 1986; A263; 92-102
202. Luft BJ, Jiang W, Munoz P, Dattwyler RJ, Gorevic PD. Biochemical and immunological characterization of the surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 1989; 57; 3637-3645
203. Bunikis J, Olsen B, Westman G, Bergsröm S. Variable serum immunoglobulin responses against different *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in a population at risk for and patients with Lyme disease. *J. clin. Microbiol.* 1995; 33; 1473-1478
204. Szczepanski A, Benach JL. Lyme-Borreliosis: host responses to *Borrelia burgdorferi*. *Micrbiol. Rev.* 1991; 55; 21-34

- 
205. Sadziene A, Thompson PA, Barbour AG. In vitro inhibition og *Borrelia burgdorferi* growth by antibodies. J. Infect. Dis. 1993; 167; 165-172
  206. Probert WS, Allsup KM, LeFebre RB. Identification and characterization of a surface-exposed, 66-kiodalton protein from *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 1995; 63; 1933-1939
  207. Rasiah C, Schlitz E, Reichert J, Vogt A. Purification and characterization of a tryptic peptide of *Borrelia burgdorferi* flagellin, which reduces cross-reactivity in immunoblots and ELISA. J. Gen. Microbiol. 1992; 138; 147-154
  208. Schneider T, Lange R, Rönspeck W, Weigelt W, Kölmel HW. Prognostic B-cell epitopes on the flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 1992; 60; 316-319
  209. Benach JL, Coleman JL, Garcia-Monco JC, Deponte PC. Biological activity of *Borrelia burgdorferi* antigens. Ann. NY Acad. Sci. 1988; 539; 115-125
  210. Harris A, Rosenberg AA, Riedel LM. A microfloculation test for syphilis using cardiolipin antigen. J. Vener. Dis. Inf. 1946;
  211. Pangborn MC, Almeida JO, Maltaner F, Siverstein AM, Thompson WR. Cardiolipin antigens. WHO, Monograph Series, Geneva 1955.
  212. Portnoy J. Modification of the rapid plasma (RPR) card test for syphilis for use in large scale testing. Am. J. Clin. Pathol. 1963; 40; 473-479
  213. U.S. deoartment of Health, Education and Welfare, Natinal Communicable Center. Manual of Test of Syphilis. Venereal Disease Program 1969
  214. Coffey EM, Bradford L. Serodiagnosis of Syphilis. Manual Clinical Immunology 1980; 74; 530-541
  215. Steere AC. Lyme disease – a growing threat to urban populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91; 2378-2383
  216. Kramer MD, Wallich R, Simon MM. Mechanismen der Pathogenese und Protektion bei der Lyme-Borreliose. Süss J (Hrsg.): Durch Zecken übertragbare Erkrankungen – FSME und Lyme-Borreliose. 3. Potsdamer Symposium 1995. Weller Verlag
  217. Alonso-Llamazares J, Persing DH, Anda P, Gibson LE, Rutledge BJ, Iglesias L. No evidence for *Borrelia burgdorferi* infection in lesions of morphea and lichen sclerosus et atrophicus in Spain. A prospective study and literature review. Acta Derm. Venereol. 1977; 77 (4); 299-304

- 
218. Matthews HM, Yang TK, Jenkin HM. Alk-1-enyl ether phospholipids (plasmalogens) and glycolipids of *Treponema hyodysenteriae*. *Biochemica et Biophysica Acta* 1980; 618; 273-281
219. Morrison DC, Jacobs DM. Lipopolysaccharides and endotoxin. In: Sirois P, Rola-Pleszczynski M. *Immunopharmacology*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press 1982: 169-197
220. Mackworth-Young CG, Harris EN, Steere AC et al. Anticardiolipn antibodies in Lyme Disease. *Arthritis Rheum.* 1989; 31; 1052-1056
221. Pedersen NS, Orum O, Mouritsen S. Enzyme-linked immunoabsorbent assay for detection of antibodies to the Veneral Disease Research Laboratory (VDRL) antigen in syphilis. *J. clin. Microbiol.* 1987; 25; 1711-1716
222. Garcia-Monco JC, Fernandez Villar B, Benach JL. Adherence of the Lyme disease spirochete to glial cells and the cells of glial origin. *J. Infect. Dis.* 1989; 160; 497-506
223. Isaacs, RD. *Borrelia burgdorferi* bind to epithelial cell proteoglycans. *J. Clin. Invest.* 1994; 93; 809-819
224. Stults CLM, Sweeley CC, Macher BA. Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties. *Methods Enzymol.* 1989; 179; 167-214
225. Garcia-Monco JC, Fernandez Villar B, Szczepanski A, Benach JL. Cytotoxicity of *Borrelia burgdorferi* for cultured rat glial cells. *J. Infect. Dis.* 1991; 163; 1362-1366
226. Wirguin I, Suturkova-Milosevic L, Della-Latta P, Fisher T, Brown RH, Latov N. Monoclonal IgM antibodies to GM1 and asialo-GM1 in chronic neuropathies cross-react with *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides. *Ann. Neurol.* 1994; 35; 698-703
227. Mishu B, Blaser MJ. Role of infection due to *Campylobacter jejuni* in the initiation of Guillain-Barre-Syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 17; 101-108
228. Radolf JD, Arndt LL, Akins DR, Curetty LL, Levi ME, Shen Y, Davis LS, Norgard MV. *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocyte/macrophages. *J. Immunol.* 1995; 154; 2866-2877
229. Platt FM, Butters TD. New therapeutic prospects for the glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Biochem Pharmacol.* 1998 Review; 15;56 (4);421-30.
230. Hirano T, Hashimoto H, Shiokawa Y, Iwamori M, Nagai Y, Kasai M, Ochiai Y, Okumura K. Antiglycolipid antibody detected in the sera from systemic lupus erythematosus patients. *J. Clin. Invest.* 1980; 66; 1437; 1440



- 
231. Gleeson PA. Glycoconjugates in autoimmunity. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1197; 237-255
232. Shaw N. Bacterial glycolipids and glycophospholipids. *Adv. Microb. Physiol.* 1975; 12; 141-167
233. Fischer W. Newly discovered lipids from Streptococci. *Lipids* (R. Paoletti, G. Porcellatti, G. Jacini, Ed.) 1976; Raven Press, NY; 255-266
234. Marchase RB. Biochemical investigations of retinectal adhesive specificity. *J. Cell. Biol.* 1977; 75; 237-257
235. Karlsson KA. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Ann. Rev. Biochem.* 1989; 58, 309-350
236. Adams GA, Singh PP. Structural features of Lipid A preparations isolated from *E. coli* and *S. flexneri*. *Biochim. Biophys. Acta* 1970; 202; 553-555
237. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Brade H et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994; 8; 217-225
238. Rietschel ET, Brade H, Holst O, Schumann RR et al. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr. Topics in Microbiol. Immunol* (E.T. Rietschel, H. Wagner, Ed.) 1996; 40-81; Springer-Verlag, Berlin
239. Kiarash A, Boyd B, Lingwood CA. Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. *J. Biol. Chem.* 1994; 1269; 11138-11146
240. Hamilton KS, Briere K, Jarrell HC, Grant CWM. Acyl chain length effects related to glycosphingolipid crypticity in phospholipid membrane: probed by 2H-NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1190; 367-375
241. Satz N. Klinik der Lyme-Borreliose. Verlag Hans Huber 1993; 12
242. Hovind-Hougen K, Asbrink E, Stiernstedt G, Steere AC, Hovmark A. Ultrastructural differences among spirochetes isolated from patients with Lyme disease and related disorders, and from *Ixodes ricinus*. *Zbl. Bakt. Hyg.* 1986; A263; 103-111
243. Gray JS, Kahl O, Robertson JN, Daniel M, Estrada-Pena A, Gettinby G, Jaenson TG, Jensen P, Jongejan F, Korenberg E, Kurtenbach K, Zeman P. Lyme borreliosis habitat assessment. *Zbl. Bakteriologie*. 1998; 287 (3):211-28.
244. Gylfe, Olsen B, Strasevicius D, Marti Ras N, Weihe P, Noppa L, Ostberg Y, Baranton G, Bergstrom S. Isolation of Lyme disease *Borrelia* from puffins (*Fratercula arctica*)

- and seabird ticks (*Ixodes uriae*) on the Faeroe Islands. J. Clin. Microbiol. 1999; 37 (4): 890-896
245. Lehninger A. Der supramolekulare Bau von Membranen. Aus: Prinzipien der Biochemie (Lehninger, Nelson, Cox; ED.), 2. Auflage 1994; Seite 315; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

## Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie unter der damaligen Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-J. Wellensiek und am Biochemischen Institut des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Geyer durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-J. Wellensiek für das interessante Thema der Doktorarbeit, die hervorragende Betreuung und seine ständige Diskussionsbereitschaft in all den Jahren der Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Geyer danke ich für die exzellente Betreuung und Kooperation seitens des Institutes für Biochemie, sein stetiges Interesse an dieser Arbeit und die zahlreichen Diskussionen und Anregungen.

Herrn Dr. G. Lochnit gilt auch mein besonderer Dank für die Einführung in die Glycolipid-Analytik, sein stetes Interesse an dieser Arbeit, die zahlreichen Diskussionen und die hervorragende Zusammenarbeit. Ohne seine hilfreiche und hochqualifizierte Mitarbeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Chakraborty danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine engagierte und motivierende Betreuung und die stets gewährte Unterstützung.

Herrn W. Mink, S. Kühnhardt und P. Kaese danke ich für die umfangreiche Mitarbeit bei den Methylierungsanalysen und massenspektrometrischen Untersuchungen.

Recht herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institut für Medizinische Mikrobiologie und des Biochemischen Instituts für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Frau C. Lanz möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen für die geistige und moralische Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Geschwistern für ihre stetige Motivation und Geduld.

## **Lebenslauf**

**Hamid HOSSAIN**

**Heinrich-Berbalkstr. 54G**

**60437 Frankfurt**

08.12.1968	Geboren in Karachi/Pakistan als Sohn der Eheleute Sabra Hossain, geb. Khatoon, und Amir Hossain, Wirtschaftsexperte
Herbst 1974	Immigration nach Deutschland
1975-1979	Heinrich-Seliger-Grundschule, Frankfurt
1979-1988	Wöhler-Gymnasium, Frankfurt
1988-1995	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen

## **Prüfungen**

April 1991	Ärztliche Vorprüfung
April 1992	Erster Abschnitt der ärztl. Prüfung
August 1994	Zweiter Abschnitt der ärztl. Prüfung
Oktober 1995	Dritter Abschnitt der ärztl. Prüfung

## **Famulaturen**

August 1991	Famulatur in der chirurgischen Abteilung des St. Marienkrankenhauses in Frankfurt
August 1992	Famulatur in Innerer Medizin im Diakonissen-Krankenhaus in Frankfurt
September 1992	Auslandsfamulatur in der Praxis eines niedergelassenen Allgemeinmediziners in Karachi, Pakistan

Feb.- März 1993	Auslandsfamulatur in der Pädiatrie der Aga Khan University of Karachi, Pakistan
April 1993	Auslandsfamulatur in der Neonatologie der Aga Khan University of Karachi, Pakistan

### **Praktisches Jahr**

Okt. 94 - Feb. 95	Chirurgie an der Justus-Liebig-Universität, Gießen (Allgemein-, Thorax- und Unfallchirurgie)
Feb. 95 - Jun. 95	Innere Medizin an der Justus-Liebig-Universität, Gießen (Med. Klinik II, Kardiologie)
Jun. 95 - Sep. 95	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde an der Justus-Liebig-Universität, Gießen

### **Arzt im Praktikum**

Dez. 95 - Sep. 96	Mikrobiologie am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen
Okt. 96 - Mai 97	Innere Medizin an der Medizinische Klinik II der Justus-Liebig-Universität, Gießen

### **Assistenzarzt**

Jun. 97 - Sep. 97	Assistenzarzt auf der Privatstation A unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Seeger in der Abteilung für Innere Medizin an der Medizinischen Klinik II der Justus-Liebig-Universität, Gießen
Seit Januar 1998	Assistenzarzt am Institut für Medizinische Mikrobiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Chakraborty am Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen

### **Promotionsarbeit**

1999	Am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität zu Gießen, unter der damaligen Leitung von Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Wellensiek: Lipide von <i>Borrelia burgdorferi</i> (Summa cum laude)
------	--

### **Veröffentlichung**

- Domann E, **Hossain MH**, Füssle R und Chakraborty T. Schneller und zuverlässiger Nachweis multiresistenter Staphylococcus aureus (MRSA) durch Multiplex-PCR. DMW 2000; 20: 613-618
- **Hossain MH**, Wellensiek HJ, Geyer R and Lochnit G. Lipids of *B. burgdorferi* (eingereicht bei Infection and Immunity)

### **Kongressbeiträge**

- Structural analysis of the lipids of *B. burgdorferi*. 2. Frankfurt/Giessen Borrelia Workshop Juni 1997, DGHM, Frankfurt
- Lipids of *B. burgdorferi* – a structural and immunological analysis. Postervortrag auf dem
- IBC Int. Conference on Spirochete Diseases Oktober 1998 am M.I.T. in Cambridge (Boston, MA), USA
- Lipids of *B. burgdorferi* – a structural and immunological analysis. 10<sup>th</sup> Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycokonjugaten in November 1998 in Nuland, Netherland
- Schneller und zuverlässiger Nachweis multiresistenter Staphylococcus aureus (MRSA) durch Multiplex-PCR. Jahrestagung der DGHM Oktober 1999, Regensburg
- Epidemiologie nosokomialer Acinetobacter-Infektionen auf einer Neurologischen Intensivstation. Jahrestagung der DGHM Oktober 1999, Regensburg

### **Fremdsprachen**

Englisch, Französisch, Urdu (Pakistanisch), Bangla, Hindi

### **Mitgliedschaften**

- Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)
- Federation of European Microbiological Societies (FEMS)
- International Union of Microbiological Societies (IUMS)